LIGIA SIMIONESCU

RADIO-IMUNO-ANALIZA HORMONILOR

EDITURA MEDICALĂ

Scanned with OKEN Scanner

LIGIA SIMIONESCU

RADIO-IMUNO-ANALIZA HORMONILOR

EDITURA MEDICALĂ – BUCUREȘTI 1982

Scanned with OKEN Scanner

Redactor de carte: Dr. GEORGE ALGEORGE
Tehnoredactor: ELENA AFILIPOAIE

Bun de tipar: 27.VII.1982
Formatul: 16/70×100
Hîrtie: scris I A 70×100/56
Coli de tipar: 23,25

Tiparul executat I. P. Sibiu

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

Această lucrare a fost elaborată cu intenția de a pune la dispoziția unui cerc tot mai larg de specialiști datele necesare pentru utilizarea cît mai corectă și mai fructuoasă a unui complex metodologic de mare interes teoretic și aplicativ. Primii beneficiari potențiali sînt medicii, biochimiștii și biofizicienii care lucrează nemijlocit cu bolnavii, fie în scopul asistenței medicale tot mai calificate, fie în cercetarea științifică.

Apărut în cadrul endocrinologiei clinice, acest domeniu metodologic depășește azi cu mult granițele medicinii umane, înscriind succese în rezolvarea problemelor de antropologie și demografie, de medicină veterinară și zootehnice, de biologie animală și vegetală, de chimie organică și radiochimie. Principiile fundamentale pot interesa pe oricine dorește să cunoască performanțele tehnicilor moderne de laborator și ele au implicații interdisciplinare din cele mai diverse — inclusiv în sectoarele informaticii și ale automatizării.

Dezvoltarea oricărei metodologii noi presupune completări și reînnoiri ale bazei materiale, ca și o documentare adecvată. Ele au fost posibile grație sprijinului primit din partea Institutului de Endocrinologie din București, al Academiei de Științe Medicale, al Ministerului Sănătății, al Consiliului Național pentru Știință și Tehnologie. De mare importanță a fost ajutorul oferit de Comitetul de Stat pentru Energia Nucleară, de P.N.U.D. (Programul Națiunilor Unite pentru Dezvoltare) și de Agenția Internațională pentru Energia Atomică — Viena, ultima susținînd eforturile autoarei prin contractele de cercetare.

Autorul

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ (I)

Pag.

1 Radioimunoanaliza şi metodele înrudite 13

1.1. Introducere şi istoric 13
1.2. Sisteme de analiză competitivă 14
1.2.1. Structura şi terminologia sistemelor CBA 14
1.3. Radioimunoanaliza 15
1.3.1. Definiţie şi principiu 15
1.3.2. Aplicabilitate 16
1.3.3. Avantaje şi dezavantaje 16
1.4. Metoda de analiză prin legare competitivă cu proteine plasmatice 17
1.4.1. Definiţie şi principiu 17
1.4.2. Aplicaţii 18
1.4.3. Avantaje şi dezavantaje 18
1.5. Metode de analiză cu proteine receptoare 18
1.5.1. Definiţie şi principiu 18
1.5.2. Aplicaţii 19
1.5.3. Avantaje şi dezavantaje 20
1.6. Sisteme de analiză neizotopice 20
1.6.1. Analiza cu enzime legate de imunosorbenţi 21
1.6.2. Imunoanaliza amplificată cu enzime 21
1.6.3. Analiza prin neutralizarea bacteriofagului 22
1.6.4. Analiza cu radicali liberi 22
1.7. Metode de analiză necompetitive 22
1.7.1. Metoda imunoradiometrică 22

2 Folosirea radioizotopilor în RIA 25

2.1. Definiţii, notaţii 25
2.2. Dezintegrarea radioactivă 25
2.3. Aparate de detectare şi măsurare a radioizotopilor 27
2.3.1. Scintilatorii 27
2.3.2. Detectorii solizi cu probă externă 27
2.3.3. Detectorii lichizi cu probe interne 29

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

2.3.4. Statistica citirii radioactivităţii 31
2.3.5. Măsurarea radioactivităţii 31
2.3.6. Obţinerea autorizaţiei de lucru cu radioizotopi 35
2.3.7. Expunerea la radiaţii 35
2.3.8. Reguli de securitate în laboratorul RIA 36
2.3.9. Utilarea unui laborator RIA 37

3 Compuşi marcaţi folosiţi în RIA 39

3.1. Marcarea polipeptidelor cu ^{125}I 39
3.1.1. Puritatea substanţei destinată marcării 39
3.1.2. Avantajele ^{125}I 39
3.1.3. Metoda de marcare cu cloramina T 40
3.1.4. Surse de eşec ale radioiodurării 41
3.1.5. Verificarea purităţii substanţei marcate 41
3.1.6. Calculul activităţii specifice (AS) 41
3.1.7. Conservarea compusului marcat 42
3.2. Marcarea substanţelor nepeptidice cu ^{125}I 42

4 Componentele reacţiei de tip antigen-anticorp 44

4.1. Antigene, haptene şi imunogene 44
4.1.1. Imunogene hormonale 44
4.1.2. Specificitatea de specie 46
4.1.3. Relaţia structură bio- şi imunoactivă 46
4.1.4. Obţinerea serurilor anti-hormoni 49
4.2. Anticorpii 50
4.2.1. Caracteristici fizico-chimice 50
4.2.2. Disocierea enzimatică a IgG 51
4.2.3. Locul (*situs*-ul) de combinare şi valenţa anticorpilor 52
4.2.4. Tehnici de obţinere a anticorpilor pentru RIA 53
4.2.5. Standardizarea antiserului 57
4.2.6. Purificarea antiserurilor 57
4.2.7. Forma de utilizare a antiserului 58
4.2.8. Conservarea antiserurilor 58
4.3. Reacţia de tip antigen-anticorp 58
4.3.1. Determinantul antigenic 59
4.3.2. Situs-ul (locul de combinare cu antigenul) 59
4.3.3. Forţele de legătură 59
4.3.4. Legea acţiunii maselor 60

5 Ansamblul sistemelor de radioimunoanaliză 63

5.1. Preparatul de referinţă sau standardul 63
5.1.1. Definiţie şi principiu 63
5.1.2. Similitudinea standard — probă biologică 64
5.1.3. Selecţia şi elaborarea standardelor 65
5.1.4. Exprimarea rezultatelor 65
5.1.5. Preparatele de referinţă în laboratoarele de rutină 66
5.2. Probele biologice 68
5.2.1. Sîngele 68
5.2.2. Alte lichide biologice 69
5.2.3. Ţesuturi 69
5.2.4. Prelevarea probelor pentru investigaţii populaţionale 70
5.3. Mediul de incubare 70
5.3.1. Sistemele tampon 70
5.3.2. Sisteme tampon proteinate 72
5.3.3. Agenţi protectori 72
5.3.4. Solvenţii organici 72
5.3.5. Concluzii 73

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

5.4. Tehnici de separare ... 73
5.4.1. Definiţie, performanţe, criterii de selecţie ... 73
5.5. Condiţii de incubare ... 77
5.5.1. Durata ... 77
5.5.2. Temperatura ... 77
5.5.3. Volumul ... 77

6 Rezultate şi supravegherea calităţii sistemelor RIA ... 79

6.1. Calculul rezultatelor ... 80
6.1.1. Citirea radioactivităţii ... 80
6.1.2. Curba standard ... 80
6.2. Performanţele sistemelor RIA şi similare ... 82
6.3. Standardizarea sistemelor RIA ... 84
6.4. Controlul calităţii rezultatelor ... 85
6.4.1. Laboratoare „sub control" ... 86
6.4.2. Măsuri generale ... 86
6.4.3. Controlul de calitate ... 87
6.5. Automatele şi sistemele RIA ... 89
6.5.1. Aspecte teoretice ... 90
6.5.2. Instalaţii pentru automatizarea RIA ... 93
6.6. Laboratorul RIA ... 95
6.7. Unităţi de măsură şi prescurtări ... 98

PARTEA SPECIALĂ (II)

Introducere ... 103

1 Peptide cerebrale ... 105

1.1. Hormoni hipofizotropi ... 105
1.1.1. Radioimunoanaliza gonadoliberinelor ... 107
1.1.2. Radioimunoanaliza tireoliberinei ... 108
1.1.3. Radioimunoanaliza somatostatinei ... 109
1.1.4. Radioimunoanaliza encefalinelor ... 110
Bibliografie ... 111

2 Hormonii hipofizei anterioare ... 114

2.1. Hormonul de creştere uman (HGH) ... 114
2.1.1. Introducere ... 114
2.1.2. Radioimunoanaliza HGH ... 115
2.1.3. Aplicaţii clinice ... 118
2.1.4. Variaţii ale HGH seric în condiţii bazale şi în cursul probelor dinamice ... 118
2.1.5. Concentraţia HGH în LCR ... 124
2.2. Hormonul tireotrop uman (h-TSH) ... 125
2.2.1. Introducere ... 125
2.2.2. Radioimunoanaliza h-TSH ... 125
2.2.3. Aplicaţii ... 127
2.2.4. Rezultate ale RIA-TSH în ser ... 127
2.3. Hormonul adrenocorticotrop (ACTH) ... 127
2.3.1. Introducere ... 130
2.3.2. Metode de cantificare ... 132
2.3.3. Metoda RIA pentru ACTH ... 132
2.3.4. Aplicaţii clinice şi rezultate ... 135
2.4. Gonadotrofinele hipofizare: hormonul luteinizant (LH) şi hormonul foliculostimulant (FSH) ... 140
2.4.1. Introducere ... 140
2.4.2. Metode de cantificare a LH şi FSH ... 146

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

2.4.3. Metode RIA pentru LH și FSH 146
2.4.4. Aplicații clinice și rezultate 149
2.5. Prolactina (Prl) 154
2.5.1. Introducere 154
2.5.2. Metode biologice de cantificare 157
2.5.3. Sisteme RIA pentru măsurarea prolactinei 158
2.5.4. Aplicații clinice și rezultate 161
Bibliografie 163

3 Hormonii neurohipofizari și ai pinealei și proteinele de transport 168

3.1. Ocitocina 171
3.1.1. Introducere 171
3.1.2. Reglarea secreției 171
3.1.3. Metode biologice de cantificare 171
3.1.4. Metoda RIA pentru cantificarea ocitocinei 172
3.1.5. Aplicații și rezultate 177
3.2. Vasopresina 177
3.2.1. Introducere 177
3.2.2. Metode de cantificare 178
3.2.3. Radioimunoanaliza vasopresinei 179
3.2.4. Aplicații clinice și rezultate 182
3.3. Vasotocina 184
3.3.1. Introducere 184
3.3.2. Metode de cantificare 185
3.3.3. Radioimunoanaliza arginin-8-vasotocinei 186
3.3.4. Aplicații și rezultate 186
3.4. Melatonina 186
3.4.1. Introducere 186
3.4.2. Metode de cantificare 188
3.4.3. Radioimunoanaliza melatoninei 188
3.4.4. Aplicații și rezultate 189
3.5. Neurofizinele 190
3.5.1. Introducere 190
3.5.2. Radioimunoanaliza neurofizinelor 192
3.5.3. Aplicații și rezultate 193
Bibliografie 194

4 Iodotironine, iodotirozine și tiroglobuline 199

4.1. Tiroxina (T_4) 202
4.1.1. Radioimunoanaliza tiroxinei 202
4.1.2. Aplicații clinice și rezultate 204
4.2. Triiodotironina (T_3) 205
4.2.1. Radioimunoanaliza 3,5,3′-triiodotironinei 205
4.2.2. Aplicații clinice și rezultate 206
4.3. R-Triiodotironina (rT_3) 206
4.3.1. Radioimunoanaliza rT_3 207
4.3.2. Rezultate 208
4.4. Diiodotironina (T_2) 208
4.4.1. Radioimunoanaliza-3,3′-T_2 208
4.4.2. Rezultate 209
4.5. Diiodotirozina (DIT) 209
4.5.1. Introducere 209
4.5.2. Radioimunoanaliza DIT cu legare multiplă a ligandului 209
4.5.3. Rezultate 210
4.6. Tiroglobulina (Tgl) 211
4.6.1. Introducere 211
4.6.2. Sisteme RIA pentru măsurarea Tgl 212
4.6.3. Rezultate 213
Bibliografie 214

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

5 Hormonii pancreasului 216

5.1. Insulina 216
5.1.1. Introducere 216
5.1.2. Metode biologice de măsurare a insulinei 219
5.1.3. Metoda RIA pentru cantificarea insulinei 220
5.1.4. Aplicații clinice și rezultate 222
5.2. Proinsulina 229
5.3. RIA pentru peptidul-C 229
5.4. Glucagonul 230
5.4.1. Introducere 230
5.4.2. Metode biologice de cantificare 232
5.4.3. Sistem RIA pentru glucagon 232
5.4.4. Aplicații clinice și rezultate 234
Bibliografie 235

6 Sistemul renină-angiotensină-aldosteronă (RAA) 237

6.1. Introducere și considerații generale 237
6.1.1. Fiziologie 237
6.1.2. Patologia sistemului RAA 241
6.1.3. Investigarea sistemului RAA 242
6.1.4. Pregătirea pacientului și a probelor de sînge pentru investigarea sistemului RAA 242
6.1.5. Aplicațiile clinice ale investigării sistemului RAA 244
6.2. Radioimunoanaliza elementelor sistemului RAA 245
6.2.1. Radioimunoanaliza angiotensinei I 245
6.2.2. Radioimunoanaliza angiotensinei II 247
6.2.3. Radioimunoanaliza aldosteronei 248
Bibliografie 250

7 Hormoni și proteine fetoplacentare 252

7.1. Introducere 252
7.2. Gonadotrofina corionică umană (HCG) 253
7.2.1. Fiziologie 253
7.2.2. Metode de detectare și măsurare 254
7.2.3. RIA pentru HCG/LH 255
7.2.4. Beta-HCG 256
7.2.5. Aplicații clinice și rezultate 256
7.3. Lactogenul placentar 257
7.3.1. Nomenclatură 257
7.3.2. Fiziologie 258
7.3.3. Sistem RIA pentru HPL 259
7.3.4. Aspecte clinice ale măsurării HPL 260
7.4. Proteine fetoplacentare 262
7.4.1. Alfa-fetoproteina (AFP) 262
7.4.2. Antigenul carcinoembrionar (CEA) 265
Bibliografie 266

8 Hormonii steroizi 268

8.1. Introducere 268
8.1.1. Clasificare și nomenclatură 268
8.1.2. Căi de sinteză la om 268
8.1.3. Locul de sinteză 270
8.1.4. Căi metabolice 270

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

8.2. Sisteme RIA pentru hormonii steroizi 273
8.2.1. Imunogenele 273
8.2.2. Antiserurile 274
8.2.3. Steroizii marcaţi 275
8.2.4. Standardele 278
8.2.5. Probele biologice 278
8.2.6. Condiţiile de incubare 280
8.2.7. Tehnica de separare 281
8.2.8. Performanţele sistemelor RIA 281
8.2.9. Trusele RIA 282
8.3. Aspecte clinice 282
8.3.1. Consideraţii generale 282
8.3.2. Steroizi CSR 283
8.3.3. Hormonii steroizi gonadici 284
Bibliografie 290

9 Hormonii calciotropi 291

9.1. Introducere 291
9.2. Hormonul paratiroidian 292
9.2.1. Consideraţii generale 292
9.2.2. Metode de cantificare 295
9.2.3. RIA pentru Pth uman 295
9.2.4. Metoda imunoradiometrică (IRMA) 297
9.2.5. Performanţele sistemelor RIA şi IRMA 298
9.2.6. Aspecte clinice 298
9.3. Calcitonina (CT) 299
9.3.1. Consideraţii generale 299
9.3.2. Metode de cantificare a CT 301
9.3.3. RIA pentru CT umană 301
9.3.4. Aspecte clinice 303
Bibliografie 304

10 Hormonii gastrointestinali 307

10.1. Gastrina 308
10.1.1. Introducere 308
10.1.2. Metode de cantificare 310
10.1.3. Radioimunoanaliza gastrinei 310
10.1.4. Aplicaţii clinice şi rezultate 312
10.2. Secretina 313
10.2.1. Introducere 313
10.2.2. Metode de cantificare 314
10.2.3. Sistem RIA pentru cantificarea secretinei 315
10.2.4. Aplicaţii clinice şi rezultate 315
Bibliografie 315

11 Tranzine hormonale, IgE, factorii reumatoizi şi somatomedinele 317

11.1. Tranzine ale hormonilor tiroidieni 317
11.1.1. Introducere 317
11.1.2. RIA TBG 318
11.1.3. Aplicaţii clinice şi rezultate 319
11.2. Imunoglobulina E (IgE) 320
11.2.1. Introducere 320

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

11.2.2. RIA anticorpilor IgE 321
11.2.3. RIA IgE totală 321
11.2.4. Aplicaţii clinice şi rezultate 322
11.3. Factorii reumatoizi 323
11.3.1. Introducere 323
11.3.2. Tehnici de dozare 325
11.3.3. RIA în fază solidă pentru detectarea FR 325
11.3.4. Aplicaţii clinice şi rezultate 327
11.4. Somatomedinele 328
11.4.1. Introducere 328
11.4.2. Tehnici de dozare 328
11.4.3. RIA Sm-B şi RIA Sm-C 328
11.4.4. Rezultate şi aplicaţii ale RIA-Sm-B 329
Bibliografie 330

12 Antigenele virale şi bacteriene şi anticorpii lor 332

12.1. Antigenele virale şi anticorpii lor 332
12.1.1. Antigenul hepatitei B 332
12.1.2. Tehnici de detectare 332
12.1.3. Tehnica RIA 333
12.1.4. Aplicaţii şi rezultate 334
12.1.5. Alte virusuri şi anticorpi virali 335
12.2. Antigenele bacteriene şi anticorpii lor 335
12.2.1. Introducere 335
12.2.2. Tehnici clasice şi RIA 335
Bibliografie 336

13 Substanţe folosite în terapie 337

13.1. Glicozide cardiace 337
13.1.1. Generalităţi 337
13.1.2. Metode de cantificare a glicozidelor tonicardiace 339
13.1.3. Radioimunoanaliza glicozidelor tonicardiace 339
13.1.4. Aplicaţii clinice şi rezultate 341
13.2. Antibiotice 342
13.2.1. Introducere 342
13.2.2. Tehnica RIA 343
13.2.3. Indicaţiile medicale ale cantificării antibioticelor 344
13.3. Medicamente neuropsihotrope 344
13.3.1. Introducere 344
13.3.2. Tehnici de dozare 345
13.3.3. Radioimunoanaliza substanţelor neuropsihotrope 345
13.3.4. Aplicaţii clinice şi rezultate 346
Bibliografie 347

14 Eritropoietina 350

14.1. Consideraţiuni generale 350
14.2. Locul de sinteză 350
14.3. Funcţii 350
14.4. Metode de cantificare 351
14.5. Metode imunochimice 351
14.6. Radioimunoanaliza eritropoietinei 351

15 Mesageri intracelulari 355

15.1. cAMP şi cGMP 355
15.2. Prostaglandinele şi metaboliţii lor 357

ANEXA: Coproduşi ai metodelor RIA şi similare 367
Radioimunoassay of Hormones – Abstract 369

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA GENERALĂ

1

RADIOIMUNOANALIZA ŞI METODELE ÎNRUDITE

1.1. INTRODUCERE ŞI ISTORIC

Folosirea radioimunoanalizei (RIA) pentru determinarea cantitativă a diferitelor substanţe este de dată relativ recentă (1). Paralel, s-au dezvoltat o serie de alte metode numite cu un termen general analize prin legare competitivă (*Competitive Binding Assay* = CBA) (2).

Sinteză a cunoştinţelor de chimie fizică, de chimie biologică şi de imunologie, noile metode îmbină sensibilitatea tehnicilor de radiochimie cu specificitatea anticorpilor sau a proteinelor de legare. A urmat o explozie de aplicaţii şi de implicaţii care au depăşit domeniul medicinii. Ele au justificat acordarea celor mai înalte distincţii naţionale cercetărilor din S.U.A. şi din Anglia, care au deschis aceste noi drumuri, culminînd cu acordarea premiului Nobel pentru medicină, pe anul 1977, cercetătoarei americane Rosalyn Yalow.

Printre cele mai importante rezolvări aduse medicinii de metodele CBA (inclusiv RIA) se pot enumera:

— măsurarea hormonilor polipeptidici în lichide biologice complexe neprelucrate, unde se află în concentraţii de 10^{-9}—10^{-12} g/ml, noile metode întrecînd ca sensibilitate cu 4—5 ordine de mărime metodele biologice cunoscute;

— extinderea metodelor CBA — RIA şi la substanţe neantigenice ca: hormonii steroizi, unele medicamente, peptide mici, tironine ş.a.;

— crearea condiţiilor de practicabilitate în diagnosticul de rutină, *screening*-ul populaţional etc.;

— crearea premiselor descoperirii unor noi hormoni şi substanţe hormonoide şi a cercetării formelor lor de existenţă şi de transformare în organismele vii în stare normală şi patologică.

Ca şi alte metode, RIA este limitată prin faptul că ea măsoară porţiunea imunoreactivă a unei molecule care poate să nu coincidă cu porţiunea

Scanned with OKEN Scanner

biologic activă a aceleiaşi molecule. Pentru a depăşi acest inconvenient, proteine izolate din receptorul tisular natural al unei substanţe biologice active sînt folosite de cîţiva ani ca proteine specifice de legare. Imprecizia determinărilor, manifestată prin variabilitatea între dozări efectuate la diferite intervale, este un alt aspect care scade din prestigiul metodei.

Astăzi este practic imposibil să facem o listă exhaustivă a numeroaselor contribuţii şi a grupurilor care lucrează în domeniul radioimunoanalizei. Putem spune doar că numărul hormonilor peptidici dozaţi prin aceste metode trece de 25, iar numărul substanţelor peptidice şi nepeptidice dozate trece de 500; multe din acestea nu pot fi măsurate prin nici o altă metodă. Teoretic, aplicînd principiul acestor metode, poate fi măsurată concentraţia oricărei substanţe cu activitate biologică.

Materialul din paginile care urmează va fi sistematizat în două părţi: o parte generală şi o parte specială, care tratează aplicaţiile în clinica umană.

Partea generală este elaborată cu intenţia de a deveni un îndreptar metodologic pentru cei care vor să îmbrăţişeze acest domeniu în ansamblu, ţinînd seama că încă nu deţinem legi şi reguli precise pentru optimizarea oricărui sistem de dozare.

Vastele posibilităţi de rezolvare ale acestor metode au dus la extinderea lor de la cadrul endocrinologiei (unde s-au născut) la numeroase alte ramuri medicale şi nemedicale. Printre ramurile medicale care beneficiază de acest nou cîmp metodologic menţionăm: ginecologia şi obstetrica, hematologia, virusologia, microbiologia, farmacologia, oncologia, nefrologia, cardiologia, psihiatria, toxicologia, epidemiologia, medicina sportivă. În ultimii ani, metodele de radioimunoanaliză sînt aplicate din ce în ce mai larg în medicina veterinară şi în zootehnie, în diferite ramuri ale biologiei, în industria medicamentelor.

Dezvoltarea rapidă şi practic infinită a acestor metode, izolarea continuă a noi proteine de legare, publicarea a numeroase variante ale tehnicii, disponibilitatea truselor comerciale pentru dozare — ceea ce permite aplicarea lor încă mai largă — necesită o iniţiere metodologică, cum este cea pe care încercăm să o realizăm în cele ce urmează.

1.2. SISTEME DE ANALIZĂ COMPETITIVĂ

Pornind de la metodele RIA, sistemele CBA s-au diversificat prin înlocuirea unui reactiv cu altul sau prin modificări în desfăşurarea tehnicii.

1.2.1. STRUCTURA ŞI TERMINOLOGIA SISTEMELOR CBA

Patru reactivi alcătuiesc baza structurală a sistemelor CBA: ligandul nemarcat, ligandul marcat substanţa de legare şi separatorul. Ligandul nemarcat este substanţa care este măsurată şi este folosit sub două forme: preparat de referinţă sau standard şi lichid sau ţesut biologic.

Scanned with OKEN Scanner

Ligandul nemarcat este, în general, o substanţă cu greutate moleculară relativ mică şi trebuie să prezinte proprietatea de a putea fi legat specific de substanţa de legare. În RIA, ligandul este un antigen (Ag) sau o haptenă (hp). În cursul determinării, ligandul apare sub două forme: liber şi legat. Pentru formele liber şi legat păstrăm simbolul anglosaxon de F (free) şi B (bound) întrucît în limba română litera „L" pentru ambele pretează la confuzii.

Ligandul marcat este o substanţă identică cu ligandul nemarcat, în molecula căruia a fost introdus un izotop radioactiv. Ca şi ligandul nemarcat sau rece, ligandul marcat sau cald se găseşte în sistem sub forma liberă (F) şi legată (B).

Substanţa de legare este, în general, o proteină: anticorp în RIA, proteină plasmatică sau transportoare în CBPA, proteină tisulară sau receptoare în radioreceptor analiză (RRA). Aceasta are proprietatea de a complexa specific ligandul nemarcat şi pe cel marcat. Complexele formate de substanţa de legare cu ligandul pot fi complexe nemarcate şi complexe marcate.

Separatorul poate fi o substanţă adsorbantă sau precipitantă, un proces fizic sau o combinaţie a lor.

Folosirea ca separatori a unor substanţe se bazează pe afinitatea acestora fie pentru ligand, fie pentru substanţa de legare. Separatorul permite despărţirea componentelor reacţiei în două compartimente: liber (F) şi legat (B). Aceste noţiuni pot fi întîlnite şi în alte manuale care tratează probleme similare (3,15).

Deşi denumirea de analiză prin legare competitivă (CBA = Competitive Binding Assay) este folosită curent pentru a desemna acele tipuri de analiză în care nu intervine o reacţie de tip antigen-anticorp, ea mai este folosită (cu riscul unor confuzii) pentru a desemna orice analiză prin legare competitivă, inclusiv RIA. Vom păstra de aceea pentru sistemele de analiză competitivă prin legare la o proteină plasmatică prescurtarea CBPA (competitive binding protein assay = analiza prin legare competitivă cu o proteină).

1.3. RADIOIMUNOANALIZA

1.3.1. DEFINIŢIE ŞI PRINCIPIU

Radioimunoanaliza (RIA) a fost introdusă de Yalow şi Berson (1). Este un caz particular al CBA, în care ligandul este un antigen (sau o haptenă) iar *binder*-ul (substanţa de legare) este anticorpul. Sistemul de dozare se bazează pe competiţia dintre antigenul marcat şi cel nemarcat pentru locurile de legare ale anticorpului.

Antigenul nemarcat (Ag) în concentraţii crescătoare este incubat împreună cu o cantitate fixă de anticorp specific, în prezenţa unei cantităţi fixe de antigen marcat (*Ag). După separarea antigenului liber de cel legat de anticorp, măsurarea radioactivităţii permite observaţia că radioactivi-

Scanned with OKEN Scanner

tatea legată de anticorp este invers proporţională cu cantitatea de antigen nemarcat introdusă în reacţie.

Principiul metodei este ilustrat în figura I.1.1.

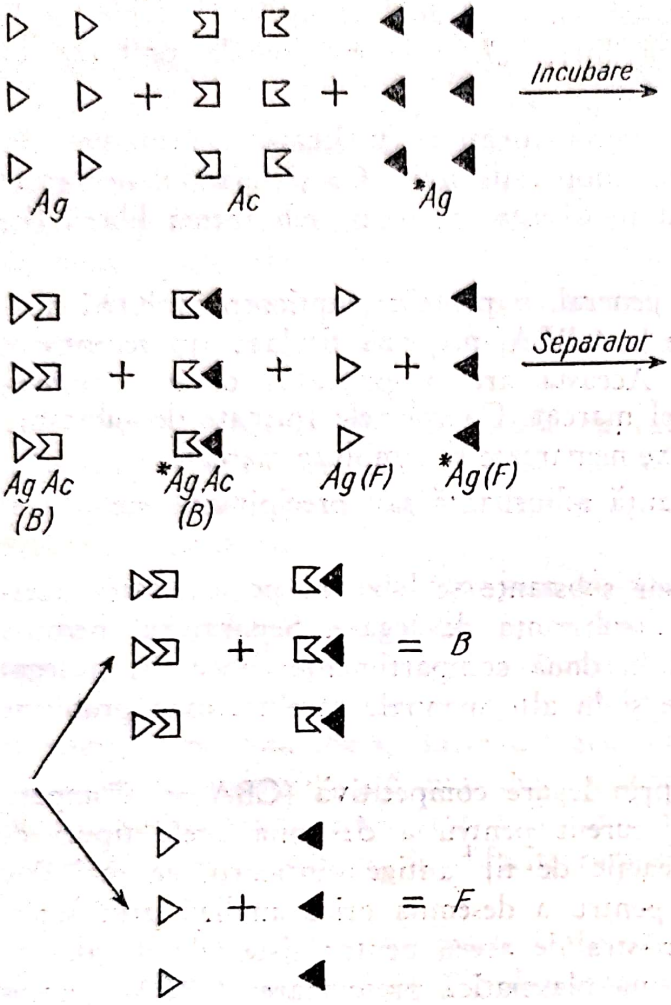


Fig. I.1.1. Principiul radioimunoanalizei (RIA): *Ag* = antigen nemarcat; **Ag* = antigen marcat; *Ac* = anticorp; *F* = fracţiunea liberă; *B* = fracţiunea legată.

1.3.2. APLICABILITATE

Teoretic, sistemele de dozare RIA pot fi aplicate oricărei substanţe care poate induce, prin ea însăşi (antigene) sau prin cuplare cu o substanţă imunogenă (haptene), formarea anticorpilor specifici.

Pentru aplicaţii medicale, au fost create sisteme RIA pentru următoarele categorii principale de substanţe: hormoni proteici şi polipeptidici, substanţe hormonoide, hormoni steroizi, tironine, prostaglandine, nucleotide ciclice, proteine virale, pentru unele medicamente şi pentru proteine specifice sarcinii şi tumorilor.

1.3.3. AVANTAJE ŞI DEZAVANTAJE

Majoritatea avantajelor sînt dependente de calitatea antiserului. Principalele *avantaje* ale sistemelor RIA:

— specificitatea: Ac. discerne substanţe cu structuri similare;

— sensibilitatea: de ordinul picogramelor;

— stabilitatea: Ac. odată preparat, poate fi folosit cîţiva ani;

— randamentul: 1 ml de antiser cu titrul 1 : 100 000 poate fi folosit pentru 1 milion de determinări;

— sistemele de dozare ale steroizilor, prostaglandinelor, tironinelor şi nucleotidelor ciclice pot fi folosite la orice specie.

Dezavantaje:

— sistemele RIA detectează porţiunea imunoreactivă a moleculei analizate care nu coincide obligatoriu cu molecula bioactivă;

— sistemele RIA pentru hormonii hipofizei anterioare şi pentru alţi hormoni polipeptidici umani nu pot fi folosite la alte specii;

— fiecare nouă tranşă de antiser trebuie controlată.

Scanned with OKEN Scanner

1.4. METODA DE ANALIZĂ PRIN LEGARE COMPETITIVĂ CU PROTEINE PLASMATICE

Principiul analizei prin legare competitivă cu proteine plasmatice (CBPA=*Competitive Binding Protein Assay*) (2) a fost aplicat inițial sistemelor de dozare a tiroxinei (2) și vitaminei B_{12} (4) și apoi hormonilor steroizi (5).

1.4.1. DEFINIȚIE ȘI PRINCIPIU

Sistemele CBPA sînt sisteme de analiză competitivă neimunitare, în care substanța de legare (*binder*-ul) este o proteină plasmatică transportoare sau de tranzit (*tranzine*) sau proteine din secreția exocrină a stomacului etc. (tabelul I.1.1.)

Determinările prin metoda CBPA au fost aplicate acelor substanțe pentru care au putut fi detectate proteine naturale cu afinitate și specificitate convenabile (tabelul I.1.1.).

Tabelul I.1.1.

Liganzi și proteine de legare în sistemele CBPA

Ligandul	Proteina de legare (*binder*-ul)	Sursa
Tironine: Tiroxina (T_4)	TBG = *Thyroxine Binding Globulin*	donatori de sînge gravide persoane tratate cu estrogeni
Steroizi: corticala suprarenală (CSR) cortizol corticosteron 11-dezoxicortizol 11-dezoxicorticosteron cortizon Gonade progesteron 17 α OH-progesteron testosteron estradiol	CBG = *Corticosteroid Binding Globulin* sau transcortin SHBG = *Sexual Binding Globulin*	donatori de sînge persoane tratate cu estrogeni ± dexametazonă donatori de sînge persoane tratate cu estrogeni ±dexametazonă femeie gravidă trim IV
Vitamina B_{12}	TC I = Transcobalamină I TC II TC III FI = factor intrinsec	ser uman normal ser leucemie mieloidă ser găină ser uman normal ser făt uman suc gastric uman sau porcin
Acid folic (PGA)	Proteină din lapte	lapte uman sau bovin
Fier	Transferină	plasmă umană

Scanned with OKEN Scanner

Procedeul de analiză implică două etape principale: pregătirea probei necunoscute prin îndepărtarea, atît a proteinelor de legare prezente în probă, cît și a competitorilor și cantificarea (tabelul I.1.2.).

Tabelul I.1.2.

Fazele tehnicii de analiză prin legare competitivă cu proteine plasmatice

I. Prepararea probei biologice
1. deproteinizare
2. purificare
II. Cantificarea
1. Echilibrarea probei cu ligandul marcat și cu proteina de legare
2. Separarea fracțiunii libere de cea legată

1.4.2. APLICAȚII

Proteinele de legare naturale prezintă unele caracteristici comune cu anticorpul și cu proteinele receptoare iar performanțele metodelor CBPA sînt comparabile, în unele privințe, cu ale metodelor RIA sau cu radioreceptori. Cu toate acestea, unele simplificări esențiale oferite de RIA, în special în ceea ce privește fazele preliminare de extracție și de purificare a probelor biologice, fac ca metodele CBPA să fie folosite numai dacă sistemele imunologice nu sînt disponibile (6).

1.4.3. AVANTAJE ȘI DEZAVANTAJE

Avantajele metodei CBPA sînt datorite în special ușurinței cu care pot fi obținute proteinele de legare, dar specificitatea și afinitatea redusă a acestora a dus la înlocuirea lor cu metodele RIA pentru dozarea hormonilor steroizi și tironinici.

1.5. METODE DE ANALIZĂ CU PROTEINE RECEPTOARE

În radioreceptor analiză (RRA), proteina de legare este o proteină tisulară intracelulară sau o componentă a membranei. Recent, și metodele CBPA au fost incluse printre metodele RRA (3), admițînd că și tranzinele funcționează ca niște receptori naturali.

1.5.1. DEFINIȚIE ȘI PRINCIPIU

RRA este o metodă de determinare cantitativă sau calitativă a unei substanțe, bazată pe reacția competitivă dintre ligandul nemarcat și cel marcat pentru situsurile de recunoaștere a unor proteine naturale intracelulare sau de membrană. Metoda RRA permite informații asupra moleculei bioactive a ligandului dar, în anumite condiții, și unele informații cu privire la starea de normalitate a receptorilor tisulari. Metodele de analiză cu proteine

Scanned with OKEN Scanner

receptoare deschid calea studiului mecanismelor activității biologice cu ajutorul metodelor *in vitro*, mult mai simple și mai reproductibile decît cele *in vivo*.

1.5.2. APLICAȚII

Metoda RRA este aplicabilă oricărei substanțe biologic active pentru care a fost detectată o proteină receptoare adecvată (tabelul I.1.3. și tabelul I.1.4.).

O metodă calitativă de stabilire a prezenței sarcinii începînd din ziua a 10-a de la fecundare, a fost realizată cu receptor lichid folicular bovin și ligand HCG (*Human Chorionic Gonadotropin*).

Tabelul I.1.3.

Sisteme receptor — hormoni polipeptidici

Ligandul	Țesut receptor
ACTH	Corticala suprarenală (CSR)
Hormon de creștere uman (HGH)	Limfocite umane
	Ficat
Gonadotrofine	
HCG	Testicul
	Ovar
LH	Testicul
	Ovar
FSH	Testicul
Prolactină	Țesut mamar
	Ficat și alte
TSH	Glanda harderiană
	Hipofiza anterioară
	Tiroidă
Insulină	Ficat
	Țesut adipos
	Limfocite
	Monocite
	Fibroblaști
	Placentă
	Alte
Glucagon	Ficat
	Celule beta pancreas
	Țesut adipos
Calcitonină	Rinichi
	Os
Parathormon	Os
Oxitocină	Pielea de broască
	Glanda mamară
	Țesut adipos
	Uter
Vasopresina	Rinichi
LH-RH	Hipofiză
TRH	Hipofiză
Angiotensină	Rinichi
	CSR
	Alte

Tabelul I.1.4.

Sisteme receptori — hormoni steroizi

Hormonul	Țesut receptor*	
	Normal	Patologic
Estrogeni	Uter Vagin Țesut mamar Oviduct Hipofiza anterioară Hipotalamus	Carcinom endometrial Cancer mamar
Progesterona	Uter Oviduct	
Androgeni	Prostată Vezicule seminale Glanda prepuțială Mușchi Rinichi Hipotalamus	
Glucocorticoizi	Ficat Celule limfoide Timus	Hepatom
Mineralocorticoizi	Rinichi Vezica de broască	

*** Citosolul țesuturilor țintă (receptoare)**

1.5.3. AVANTAJE ȘI DEZAVANTAJE

— *Avantajele* sînt datorate calității proteinei receptoare:
— afinitate mare (constantă de asociere mare);
— recunoașterea porțiunii bioactive a moleculei;
— pot fi folosite sisteme heterologe;
— același preparat receptor poate fi folosit pentru mai mulți hormoni;
— preparatele de celule intacte nu necesită intervenția unui agent de separare pentru izolarea ligandului liber de cel legat.

Dezavantajele țin de asemenea de preparatul receptor:
— instabil, necesită reînnoiri frecvente;
— nespecific: liganzii analogi trebuie eliminați din competiție;
— dificultăți la solubilizare (uneori);
— concentrație mică, necesitînd operații de purificare și de concentrare;
— fiecare nou preparat trebuie caracterizat.

1.6. SISTEME DE ANALIZĂ NEIZOTOPICE

Pentru laboratoarele care nu dispun de facilități de lucru cu radioizotopi au fost imaginate sisteme neizotopice care folosesc liganzi marcați cu enzime sau cu fluorocromi în locul radioligandului.

Scanned with OKEN Scanner

1.6.1. ANALIZA CU ENZIME LEGATE PE IMUNOSORBENȚI

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) este o metodă în fază solidă, care implică următorii reactivi: anticorp adsorbit în fază solidă, ligand cuplat cu o enzimă (echivalent cu $^{*}Li$), ligand în proba de cercetat și substrat (fig. I.1.2).

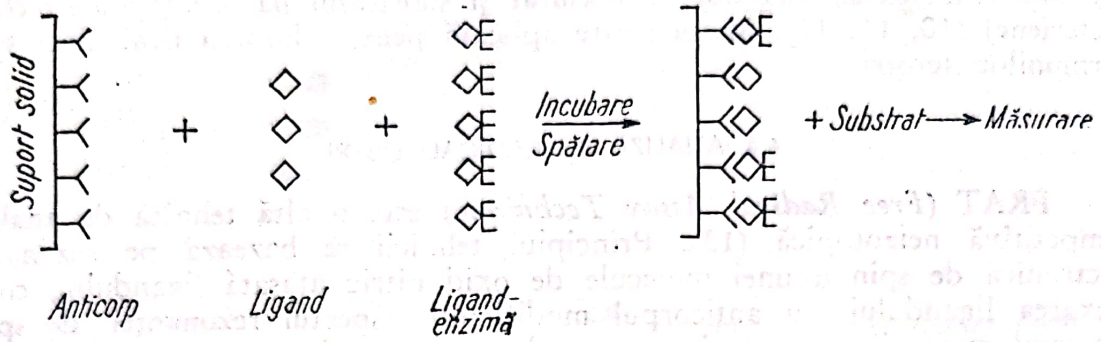


Fig. I.1.2. Schema tehnicii ELISA.

Aplicații: metoda a fost propusă pentru cantificarea IgE în serul uman (7) și este larg folosită pentru detectarea anticorpilor anti-AgHBs. Au fost propuse și alte variante ale marcării neizotopice, de exemplu cu fluorocromi (8).

1.6.2. IMUNOANALIZA AMPLIFICATĂ CU ENZIME

EMIT (*Enzyme-Multiplied Immunoassay*) este o metodă folosită pentru detectarea și cantificarea moleculelor mici cum sînt medicamentele.

Principiul se bazează pe proprietatea unor enzime ca muramidaza (lizozimul) de a ataca membrana unor microorganisme ca *Micrococcus lysodeikticus*. Suspensia tulbure de microorganisme devine clară sub acțiunea enzimei active, proces care nu mai are loc atunci cînd enzima este mascată de un anticorp (9). Gradul de turbiditate este determinat prin nefelometrie sau la anumite tipuri de fotocolorimetre (fig. I.1.3.). Sensibilitatea metodei este

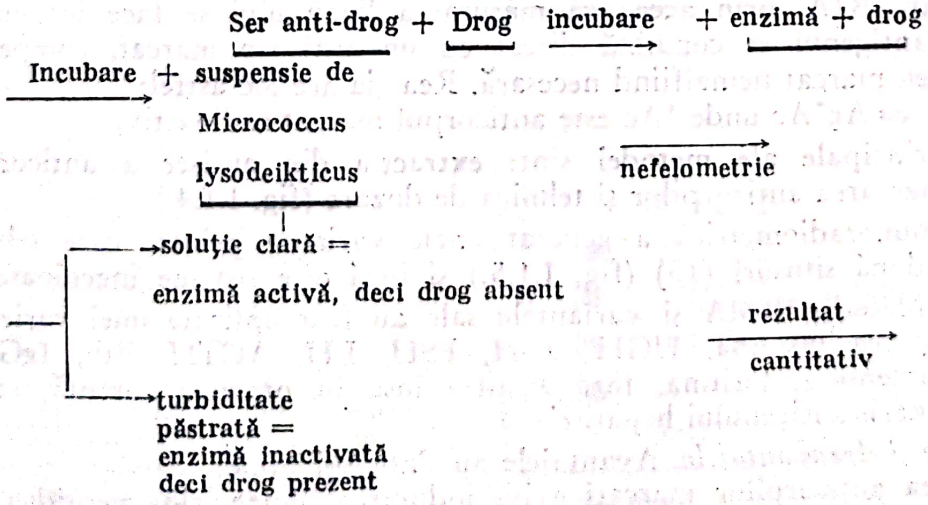


Fig. I.1.3. Principiul metodei EMIT.

de ordinul microgramelor, deci inferioară metodei RIA; ea este totuşi utilă pentru detectarea în lichidele biologice a medicamentelor sau a toxinelor.

1.6.3. ANALIZA PRIN NEUTRALIZAREA BACTERIOFAGULUI

ANB constă dintr-un sistem alcătuit din complexe ligand-bacteriofag, anticorp anti-ligand, ligandul de măsurat şi substratul bacteriofagului (celule bacteriene) (10, 11, 12). Metoda este aplicată pentru dozarea penicilinei şi a hormonilor steroizi.

1.6.4. ANALIZA CU RADICALI LIBERI

FRAT (*Free Radical Assay Technique*) este o altă tehnică de analiză competitivă neizotopică (13). Principiul tehnicii se bazează pe rezonanţa electronică de spin a unei molecule de oxid nitric ataşată ligandului, complexarea ligandului cu anticorpul modificînd aspectul rezonanţei de spin. Interesul metodei este numai teoretic, deoarece costul aparaturii o face inaccesibilă.

1.7. METODE DE ANALIZĂ NECOMPETITIVE

1.7.1. METODA IMUNORADIOMETRICĂ

Sistemele RIA îmbină sensibilitatea oferită de mijloacele de detecţie a compuşilor radiomarcaţi cu specificitatea reacţiei de tip antigen-anticorp. În reacţia dintre antigenul marcat, cel nemarcat şi anticorp, cantitatea de complex AgAc format este estimată *indirect* prin efectul său de reducere a cantităţii de complex *AgAc (fig. I.1.1.). Unele critici aduse sistemelor RIA şi anume că unele Ag (de exemplu parathormonul) suferă, prin iodurare, modificări ale structurii lor spaţiale sau nu conţin nuclee tirozinice pentru substituţia cu iod ş.a., au determinat dezvoltarea metodelor în care substanţa radioactivă este ataşată *nu* moleculei de Ag ci moleculei de Ac.

Definiţie şi principiu. Analiza imunoradiometrică (IRMA), introdusă de Miles în 1968 (14), se deosebeşte de metodele competitive deci mai ales de ruda sa apropiată RIA, prin aceea că măsurarea ligandului se face într-un sistem în care antigenul se combină direct cu un anticorp marcat, competiţia cu un antigen marcat nemaifiind necesară. Reacţia are loc astfel:

$Ag + {}^*Ac \rightleftharpoons Ag{}^*Ac$ unde *Ac este anticorpul marcat radioactiv.

Etapele principale ale metodei sînt: extracţia din antiser a anticorpilor specifici, marcarea anticorpilor şi tehnica de dozare (fig. I.1.4.).

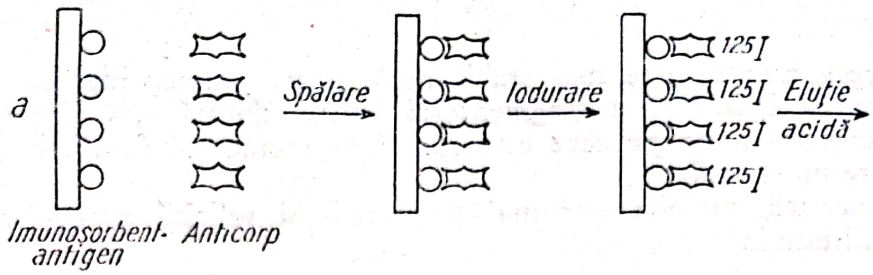
Metoda imunoradiometrică a generat unele variante printre care tehnica IRMA cu două situsuri (15) (fig. I.1.5.) şi încă alte sisteme ingenioase.

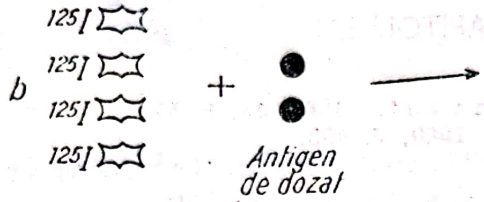
Aplicaţii. Metoda IRMA şi variantele sale au fost aplicate unei varietăţi de substanţe ca insulina, HGH, TSH, FSH, LH, ACTH, Pth, IgG, calcitonina, angiotensina, feritina, fără a intra însă în practica curentă, cu excepţia determinării antigenului hepatitei.

Avantajele şi dezavantajele. Avantajele nu sînt neglijabile:

— folosirea anticorpilor marcaţi evită iodurarea moleculelor peptidice, care uneori sînt lipsite de nuclee tirozinice sau sînt prea impure;

Scanned with OKEN Scanner





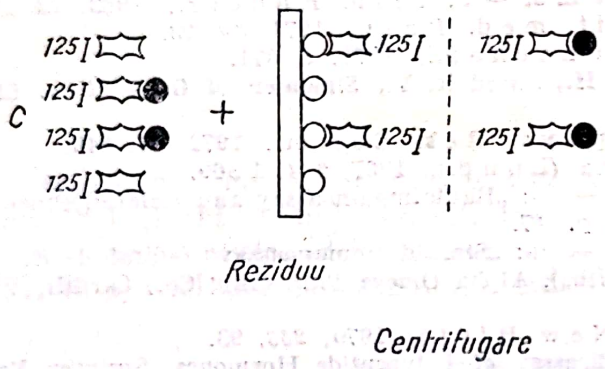
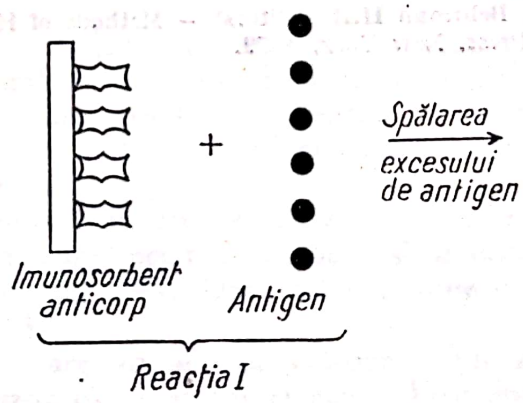


Fig. I.1.4. Reprezentarea schematică a fazelor metodei de analiză imunoradiometrică (IRMA):

a) — purificarea și iodurarea anticorpului; *b*) — prima reacție; *c*) — a doua reacție și separarea complexului anticorp marcat — antigen produs în prima reacție (supranatant) de anticorpul legat pe antigen cuplat pe imunosorbent (reziduu) obținut de a doua reacție.



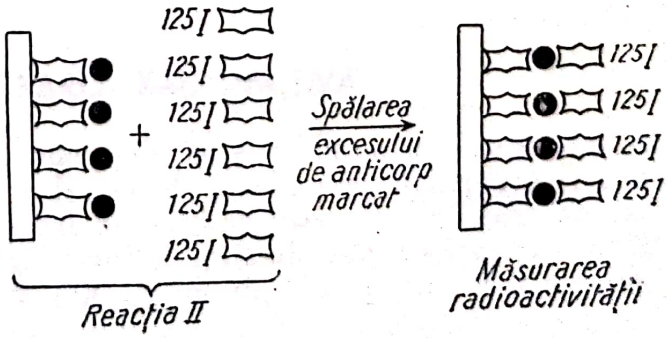


Fig. I.1.5. Reprezentarea schematică a fazelor metodei de analiză imunoradiometrică (IRMA) cu două situsuri.

— anticorpul marcat este mai stabil decît unele polipeptide marcate;
— conservarea IgG (sau a fragmentului Fab) iodurată sub forma legată pe un imunosorbent de pe care este eluată în momentul folosirii oferă un reactiv în stare purificată.

Cu toate acestea, metoda este mai laborioasă și solicită practicienilor mai multă versatilitate în lucru.

BIBLIOGRAFIE CAPITOLUL I

1. **Yalow R. S., Berson S. A.** — J. clin. Invest., 1960, *39*, 1 157.
2. **Ekins R. P.** — Clin. chim. Acta., 1960, *5*, 453.
3. **Ransom J. P.** — Practical competitive binding assay methods, Mosby Company, The C.V., Saint Louis, 1976.
4. **Rothemberg S. P.** — Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N. Y.), 1961, *108*, 45.
5. **Murphy B.E.P., Engelberg W., Patee C. J.** — J. clin. Endocr., 1963, *23*, 293.
6. **Burke C. W., Eastman C. J.** — Brit. med. Bull., 1974, *30*, 93.
7. **Engvall E., Perlmann P.** — Immunochem., 1971, *8*, 871.
8. **Curry R.E., Heitzman H., Riege D. H., Sweed R. V., Simonsen M. G.** — Clin. Chem., 1979, 25/9, 1591
9. **Rubinstein D. E.** și colab. — Biophys. Res. Comm., 1972, *47*, 846.
10. **Haimovich J.** și colab. — Nature (Lond.), 1967, *214*, 1 369.
11. **Andrieu J. M., Mamas S., Dray F.** — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, p. 47.
12. **Andrieu J. M., Mamas S., Dray F.** — În: „Steroid Immunoassay" (editat de E. H. D. Cameron, S. G. Hillier și K. Grieffiths), Alpha Omega Publishing Co., Cardiff, Wales, 1975, p. 189.
13. **Leute R.** și colab. — Nature (New Biol.), 1970, *236*, 93.
14. **Chayen J.** — The Cytochemical Bioassay of Polypeptide Hormones, Springer Verlag, Berlin, 1980
15. **Jaffe B.M., Behrman H.R** (editors) — Methods of Hormone Radioimmunoassay, ed. II-a, Academic Press, New York, 1979.

Scanned with OKEN Scanner

2

FOLOSIREA RADIOIZOTOPILOR ÎN RIA

Majoritatea marcărilor pentru sisteme RIA și similare se fac cu doi izotopi: ^{125}I și ^{3}H (tritiu). Tritiul, folosit exclusiv pentru marcarea haptenelor steroide, a nucleotidelor ciclice, a haptenelor, tinde să fie înlocuit tot cu ^{125}I, în special din cauza costului ridicat al măsurării emisiei beta a ^{3}H.

2.1. DEFINIȚII, NOTAȚII

Atomii sînt alcătuiți din nucleu sau nucleon (protoni + neutroni) și electroni mobili pe orbite. Numărul de protoni dintr-un nucleu se numește *număr atomic* sau *valoarea Z*, care specifică elementul. Se notează înaintea simbolului jos, de exemplu, pentru hidrogen: $_{1}H$ sau pentru carbon: $_{6}C$, dar obișnuit această notație este neglijată.

Suma protonilor și a neutronilor care alcătuiesc un nucleu se numește *număr de masă* sau *valoarea A*, care specifică izotopul și se notează înaintea simbolului sus, de exemplu ^{1}H sau ^{127}I. Dar iodul rămîne tot iod, chiar dacă A variază: 125, 127, 131, 132.

Atomii aceluiași element, care au aceeași valoare a lui Z dar valori diferite ale lui A se numesc izotopi ai acelui element. Frecvent se mai folosește și termenul de nuclid definit ca orice nucleu cu orbitalii săi capabil să existe un anumit interval de timp de cel puțin 10^{-10} sec. Pentru cele 103 elemente cunoscute există aproximativ 1 400 de nuclizi sau izotopi.

2.2. DEZINTEGRAREA RADIOACTIVĂ

Teoretic, adăugînd neutronii nucleului, se pot obține un număr infinit de izotopi, dar numai cîțiva sînt suficient de stabili pentru a putea fi consideraţi nuclizi. Dintre aceștia, numai anumiți nuclizi sînt suficient de stabili pentru a fi considerați eterni. Dar și instabilitatea variază în limite foarte largi. De exemplu, jumătate din atomii de ^{132}I dispar în 2 ore, iar cei de ^{125}I în 60 de zile.

Scanned with OKEN Scanner

Nuclizii instabili suferă o dezintegrare spontană pînă ce ating o stare mai stabilă; tendința este să se atingă — prin rearanjare nucleară — un raport neutroni/protoni oarecum egal cu unitatea. Procesul prin care se atinge starea stabilă se numește dezintegrare radioactivă.

Dezintegrarea radioactivă este însoțită de evenimente precise, măsurabile, care corespund unei pierderi de energie dintr-un atom sub forma de unde electromagnetice sau de particule de energie. Nuclizii care suferă de-

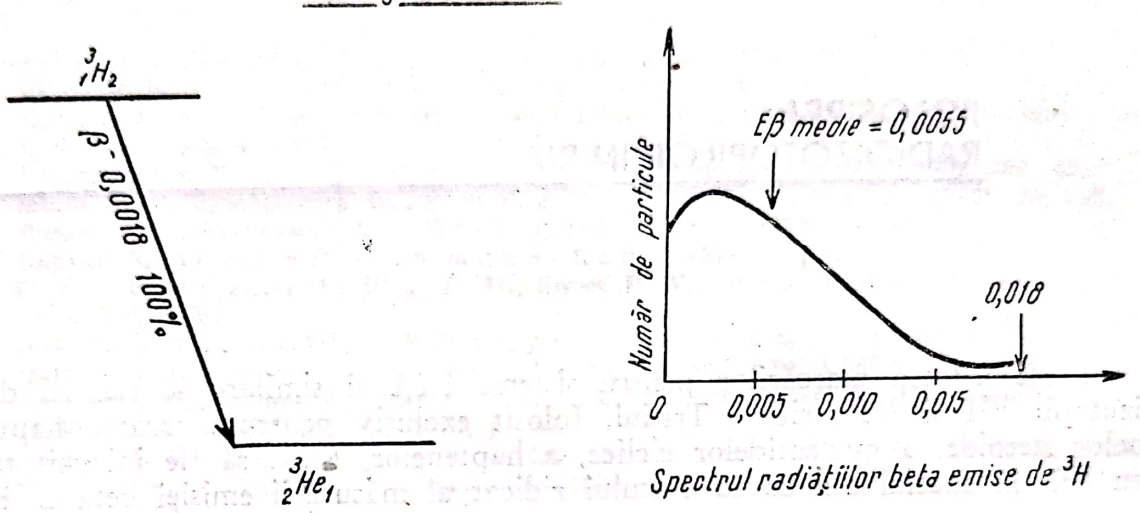


Fig. I.2.1. Schema dezintegrării și caracteristici ale tritiului (14):

T 1/2 = 12,26 ani.
Energia radiațiilor ß = 0,018 MeV.
Abundența relativă a radiațiilor = 100%.
Parcursul maxim al radiațiilor beta pentru $E_ß$ = 0,02 MeV în:

aer = 0,0052 m
apă = 0,008 mm
aluminiu = 0 0026 mm

Concentrații maxime permise, în μCi/cm²

	apă	*aer*
expunere profesională	10^{-1}	5.10^{-6}
expunere neprofesională	3.10^{-3}	2.10^{-7}

Substanțe active livrate de producători:
Hidrogen gaz
Apă tritiată
Compuși marcați
Soluții și surse etalon.

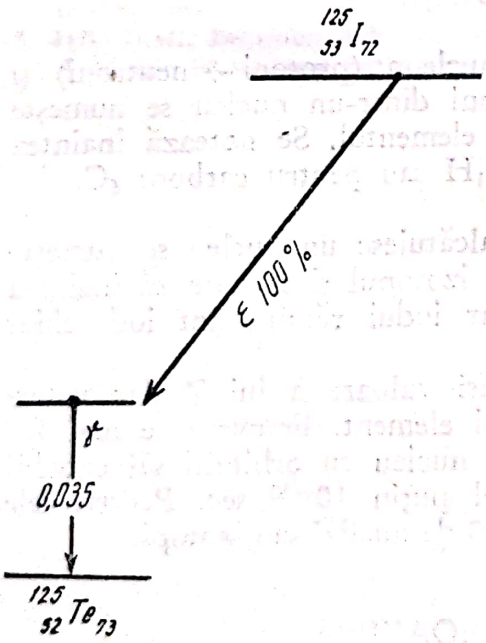


Fig. I.2.2. Schema dezintegrării și caracteristici ale ^{125}I (14):

T 1/2 = 60 zile.
Energia radiațiilor gama = 0,035 MeV.
Abundența relativă a radiațiilor (ε) = 100%.
(Emite radiații X de 0,027 MeV caracteristice Te).
Substanțe active livrate de producători:
Iodură de sodiu, NaI, soluție
Compuși marcați
Soluții etalon

zintegrare radioactivă se numesc *radioizotopi* sau *radionuclizi*. Dezintegrarea este de tip beta, cu emisia unui electron negativ (β^-) sau pozitiv (β^+), iar energia eliberată poate fi sub forma radiațiilor gama sau X (radiațiile gama sînt similare radiațiilor X dar au lungimi de undă mai scurte și energii mai mari. ^3H este un emițător β^- iar ^{125}I este un izotop γ emițător (fig. I.2.1. și I.2.2.).

Unitatea de măsură a energiei de dezintegrare este electron voltul (eV), care este echivalent cu energia cinetică pe care ar cîştiga-o un electron dacă ar fi supus unui gradient de potenţial de 1 volt. Se folosesc multiplii ai eV: 1 KeV = 10^3 eV; 1 MeV = 10^6 eV. Energia radiaţiilor beta emise de ^3H este de 0,018 MeV iar a radiaţiilor gama emise de ^{125}I este de 0,035 MeV.

Timpul de înjumătăţire ($T_{1/2}$) sau semi-viaţa unui radioizotop, definit ca interval necesar pentru a se reduce la jumătate capacitatea de dezintegrare, este caracteristic fiecărui radionuclid. $T_{1/2}$ pentru ^3H este de 12,26 ani, iar pentru ^{125}I de 60 zile.

2.3. APARATE DE DETECTARE ŞI MĂSURARE A RADIOIZOTOPILOR

Alegerea unei metode eficace de detectare şi măsurare a izotopilor radioactivi depinde în mare măsură de tipul de emisie.

La rîndul său, selecţia radionuclidului depinde de o serie de factori ca: disponibilitate, posibilităţi de conservare ($T_{1/2}$ şi auto-radioliză), periculozitate şi proprietăţi chimice. Radiaţiile alfa sînt emise numai de atomi grei, care nu se folosesc în RIA, de aceea interesează numai detectorii gama şi beta.

2.3.1. SCINTILATORII

În general, aparatele de detecţie se bazează pe capacitatea oricărui tip de radiaţie de a excita alţi atomi. Atomii excitaţi ai unor anumite substanţe produc fluorescenţă sau fascicule de lumină. Substanţele care au proprietatea de a da fluorescenţă cînd sînt expuse radiaţiei atomice se numesc fluori sau scintilatori.

Radiaţiile gama sînt cel mai eficient detectate de scintilatori sub formă solidă, de exemplu un cristal solid.

Particulele beta au penetrabilitate atît de mică încît nu pot fi măsurate eficient cu aparate cu scintilatori solizi, ci numai după încorporarea lor în scintilatori lichizi.

Aceste două diferenţe au generat două tipuri diferite de aparate de detectare şi măsurare a radiaţiilor gama şi beta. În ultimii ani însă ^3H tinde să fie înlocuit cu ^{125}I. Există suficiente motive care determină folosirea emiţătorilor gama în locul celor beta, ori de cîte ori este posibil.

2.3.2. DETECTORII SOLIZI CU PROBĂ EXTERNĂ

Aparatele bazate pe scintilatori solizi se mai numesc şi detectori cu probe externe, deoarece proba nu trebuie încorporată în scintilator.

I. *Cristalele cu scintilaţie.* La majoritatea detectorilor cu probe externe, scintilatorul solid este cristalul de iodură de sodiu cu un adaos de 0,1% de iodură de taliu, care ameliorează mult proprietăţile de fluorescenţă ale cristalelor. Chiar şi cristalele mari de iodură de sodiu prezintă o mare transparenţă optică. Se folosesc cristale cu diametrul de 2—3 inci (5,08—7,62 cm). *Eficienţa* detectării devine maximă dacă cristalul este fabricat cu o adîncitură în formă de puţ — de aceea aceste cristale se numesc detectori cu puţ sau tip puţ. Cînd proba este introdusă în puţ, pot fi detectate radiaţiile

emise în toate direcţiile, cu excepţia celor care au direcţie verticală, de aceea geometria este aproape 4 π(sferică) sau de 100%.

II. *Convertirea energiei.* Tehnica electronică a realizat instrumente nu numai pentru detectarea radiaţiilor atomice ci şi pentru citirea şi analizarea fasciculelor de lumină (fotoni) produse de radiaţii. Fotonii luminii vizibile ajung pe o *fotocatodă*, care îi converteşte în *fotoelectroni*. Mai departe, *amplificarea* şi *colectarea* electronilor determină un *impuls* de energie electrică ce va fi înregistrat şi indicat de un *analizor*. De reţinut că:

— numărul de impulsuri produs de fotocatodă este direct proporţional cu numărul de radiaţii gama care lovesc cristalul de scintilaţie şi

— mărimea de ieşire la fotocatodă este proporţională cu energia împrăştiată în cristalul de scintilaţie de către radiaţia incidentă.

III. *Analizorul* determină rata de citire şi cantitatea de energie eliberată pentru fiecare eveniment dintr-un sistem dat (înălţimea impulsului). Rata citirii nu indică numărul real de dezintegrări ale nucleelor atomice pe unitatea de timp, dar relaţia dintre rata citirii şi numărul de dezintegrări poate fi determinată pentru orice element al ansamblului (aparat, fiola în care este proba, diluentul etc.) determinînd *eficienţa*.

Unele aparate, mai costisitoare, sînt prevăzute şi cu un discriminator diferenţial sau analizor al înălţimii impulsurilor, care poate opera şi citiri integrale şi diferenţiale.

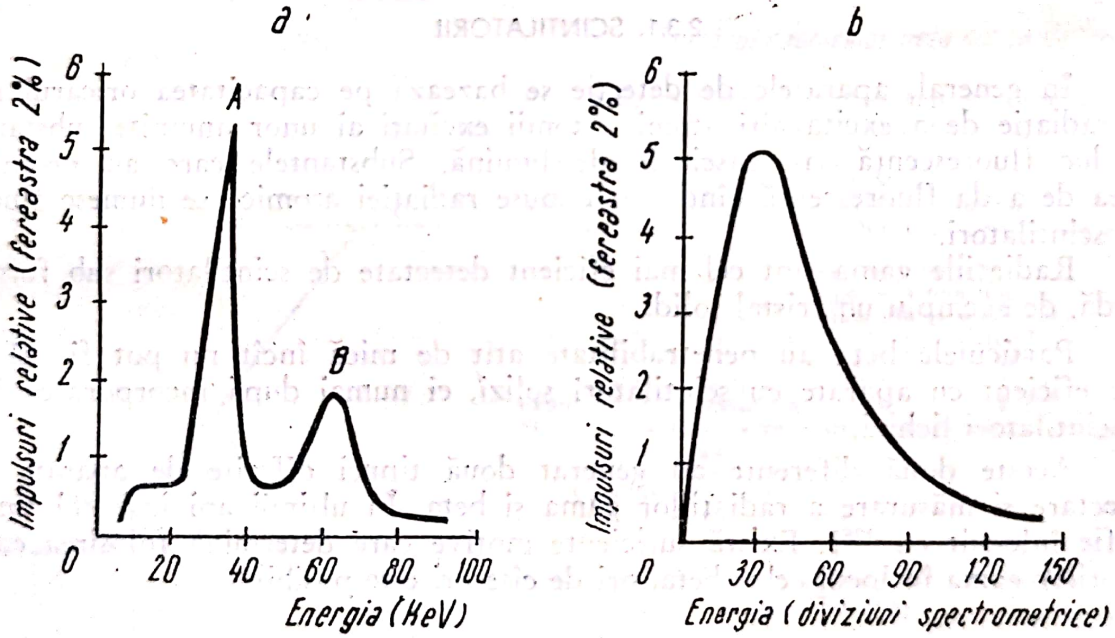


Fig. I.2.3. Spectrele de energie ale ^{125}I şi ^{3}H:

a) — ^{125}I. Fotopicul A este dat de razele X cu energii de 27,4 şi de 31,0 KeV şi de razele γ cu energia de 35,4 KeV. Picul B este datorat însumării coincidente a celor două radiaţii X sau a unei radiaţii X şi a uneia gama; *b*) — ^{3}H. Spectrul de energie al emiţătorilor beta nu prezintă fotopicuri. Spectrul lor de energie este continuu, cu o limită superioară (energia maximă), care pentru ^{3}H este de 18,6 KeV (2).

Deoarece diferitele evenimente din probă, cristal şi din circuite sînt întîmplătoare, impulsurile nu apar la ieşire la niveluri de energie discrete, ci se formează un spectru continuu (fig. I.2.3.).

Pentru citirea integrală, treapta superioară este neoperantă, dar cea inferioară permite eliminarea impulsurilor nedorite. Deci, la citirile integrale, sînt cumulate toate impulsurile peste un prag inferior stabilit de treapta inferioară.

În citirea diferențială, se stabilește și nivelul (treapta) inferior și cel superior, astfel încît să includă fotopicul, care este caracteristic fiecărui radioizotop (fig. I.2.3.).

Stabilirea nivelurilor superior și inferior (fereastră) se face, fie manual, fie cu ajutorul unor butoane pe care sînt notați radioizotopii cu care va lucra probabil practicianul și atunci este suficient să se acționeze butonul potrivit.

Avantajele citirii diferențiale constau în exactitatea citirii unui singur izotop și în posibilitatea de a citi doi sau mai mulți izotopi în aceeași probă. Pentru a citi mai mult de un izotop simultan în aceeași probă este necesar analizorul multicanal, care să aibă atîtea canale cîți radioizotopi vor fi supuși citirilor. În RIA se folosesc uneori sisteme cu trei radioizotopi: unul pentru antigen, altul pentru anticorp și un altul pentru controlul volumului (2).

IV. *Fotomultiplicatorul* are rolul de a multiplica electronii produși de fotocatodă printr-un efect în cascadă și de a-i colecta la anod pînă ce apare un impuls măsurabil. Preamplificatorul mărește impulsurile suficient pentru a activa scala.

Pentru eficiența fotomultiplicatorului, potențialul la anod este critic. Pe măsură ce crește potențialul, rata citirii crește rapid pînă ce se atinge un platou cu o rată constantă. Apoi potențialul este adus la un punct al platoului unde pătratul probei împărțit la fond să fie maxim ($P^2/F=max.$). Aceasta se face înlocuind proba cu o eprubetă goală și testînd mai multe puncte pe platou.

Sporul de amplificare. Multe aparate necesită ajustarea voltajului înalt care ajunge la fotomultiplicator. Unele tipuri de aparate sînt prevăzute cu un control sau cu un atenuator al sporului, cu care se lucrează ca mai sus pînă se atinge un raport $P^2/F=max.$ și apoi se mai crește sporul dacă dorim impulsuri mai multe.

V. *Manevrarea probelor.* Sînt disponibile aparate manuale, în care probele sînt introduse succesiv, una cîte una, în puțul detectorului, și aparate automate prevăzute cu un dispozitiv de apucare a probelor. Majoritatea sistemelor automate de măsurare a radiațiilor beta și gama sînt aparate mari și grele. Pentru măsurarea radiațiilor gama, au fost produse în ultimii doi ani aparate automate pentru 50—100 probe, miniaturizate, operînd *on line* cu ajutorul unor minicomputere.

2.3.3. DETECTORII LICHIZI CU PROBE INTERNE

Aparatele care se bazează pe scintilatori lichizi se numesc detectori cu probe interne. Încorporarea probei în scintilatorul lichid aduce atomii radioactivi în strînsă vecinătate cu atomii care vor fi excitați, astfel încît pot fi detectate și măsurate radiații cu energie și cu putere de penetrare foarte mici, cum sînt particulele beta moi. Astfel de radiații sînt capabile să excite moleculele scintilatorului, ducînd la o emisie de fotoni. Din interacțiunea fotonilor cu suprafața sensibilă a fotocatodei rezultă emisia fotoelectronilor, care trec în cascadă prin dinode și dau un impuls electronic.

I. *Scintilatorii lichizi.* Substanțele care prezintă proprietăți scintilatoare adecvate sînt în general solubile în lichide nepolare ca toluenul, solventul cel mai frecvent folosit pentru amestecurile (cocktail) de scintilație. Au fost propuse o serie de formule de preparare, fiecare avînd anumite

utilizări (3) (tabelul I.2.1.). Moleculele solventului sînt excitate, adică sînt aduse la un nivel de energie mai înalt, sub impulsul radiației și cînd revin la starea bazală ele transferă energia moleculelor solvitului. Ele emit de asemenea fotoni în regiunea ultraviolet, care nu sînt detectabili de către fotocatodă.

Tabelul I.2.1.

Clase de sisteme de scintilatori

A.	Soluții scintilatoare pentru sisteme omogene: Tip I — solvenți nepolari
B.	Soluții scintilatoare pentru sisteme omogene: Tip II — solvenți polari
C.	Soluții scintilatoare pentru sisteme heterogene: Tip I — emulsii și geluri
D.	Soluții scintilatoare pentru sisteme heterogene: Tip II — probe adsorbite pe suporți inerți.

Moleculele de solvit *primar* cîștigă energie de la moleculele de solvent și la rîndul lor emit fotoni. Anumiți solviți primari recomandați de specialiști emit lumină cu o lungime de undă în UV sau aproape de UV.

Cînd lumina rezultată din activarea solvitului primar este emisă în UV, este necesar un al doilea solvit, secundar, care absoarbe energia de la fotonii moleculelor solvitului primar și îl reemite la o lungime de undă mai lungă. Acesta se numește un comutator de undă. De exemplu, solventul poate fi toluenul, solventul primar p-terfenil și cel secundar POPOP.

Solvenții secundari sînt folosiți adesea pentru a crește solubilitatea probei (care obișnuit este polară), în solventul primar nepolar. Se folosesc, de exemplu, mici cantități de alcool în toluen pentru a facilita solubilizarea probelor de ser.

II. *Ansamblul de detectare și măsurare.* Într-un contor cu lichid de scintilație (LS), fotomultiplicatorul este dublu. Două fotocatode analizează proba și trec impulsurile prin circuite electronice separate: unul este circuitul analizor și celălalt este circuitul monitor. Un circuit în coincidență acceptă impulsurile de la ambele circuite și refuză pe cele care nu ajung simultan.

III. *Prepararea probei* este mai complicată decît pentru detectorii cu probe externe deoarece este necesar să se țină seama de calitatea containerului probei (fiola de citire) și să se controleze efectul de *quenching* sau de ștergere.

Fiolele de citire nu pot fi din sticlă obișnuită cu conținut ridicat în izotopul radioactiv natural al potasiului, ^{40}K. Cele mai convenabile fiole sînt din sticlă specială de borosilicat cu conținut redus în potasiu. Ideale, dar costisitoare, sînt fiolele din cuarț. Fiolele din polietilenă sînt utilizabile dar ele pot fi atacate de toluen și de alți solvenți organici folosiți în prepararea amestecurilor de scintilație.

Quenching este un fenomen generat de probă și de solvent, care se traduce prin reducerea numărului de fotoni emiși într-o dezintegrare și are ca urmare rezultat greșit. Există *quenching* chimic, de diluție, de culoare și optic.

Pînă de curînd, metodele de corecție a *quenching*-ului erau laborioase și lungi, dar cu aparatele moderne cu două canale se folosește metoda standardului extern.

Scanned with OKEN Scanner

2.3.4. STATISTICA CITIRII RADIOACTIVITĂȚII

Rezultatele RIA sînt expuse erorilor generate de calitatea reactivilor, a instrumentarului, de competența tehnică a practicianului etc., dar și de calitatea aparatului de măsurare a radioactivității.

Dezintegrarea atomilor radioactivi este un fenomen întîmplător. Dacă se reprezintă frecvența observațiilor față de valoarea măsurătorilor, se obține o curbă de distribuție normală, care poate fi analizată după regulile uzuale ale statisticii. Se iau în considerare doi parametri: media și deviația standard.

Dar în practică, nu se pot efectua decît una, maximum două citiri per probă, de aceea nu se poate calcula media și deviația standard. Atunci, se recurge la un substituent al deviației standard rezultat din relația:

$$p = \sqrt{n}$$

unde n este numărul total de impulsuri obținut.

Analiza curbei de distribuție normală arată că aproximativ 70% din citiri se află în limitele de ± 1p față de medie. Practic, limitele de ± 2p sînt considerate că prezintă o eroare de 0,95 sau limite de confidență de 95%. Pentru a determina rapid eroarea de citire a radioactivității, au fost imaginate nomograme (2).

Fondul cosmic: cînd numărul de impulsuri pe unitatea de timp este semnificativ mai mare decît fondul, de exemplu de 10 ori, atunci eroarea datorată fondului poate fi neglijată. Aparatele moderne sînt prevăzute cu dispozitive pentru scăderea automată a fondului, ceea ce scutește de calculul erorii generată de fond.

Cînd aparatul nu are dispozitiv de extragere automată a fondului iar numărul de impulsuri din probă nu este mare, atunci eroarea de citire trebuie corectată, pentru a include și eroarea datorată impulsurilor de fond. În acest caz, numărul global de impulsuri este alcătuit din două părți: numărul net de impulsuri și numărul de impulsuri ale fondului. Cînd citirea se face ca număr de impulsuri pe unitate de timp, atunci deviația standard a activității nete, p s, se poate determina astfel:

$$ps = \sqrt{\frac{rg}{tg} + \frac{rf}{tf}},$$

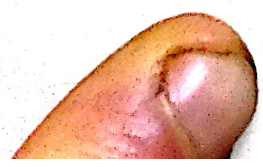
unde: rg = rata de citire globală,
rf = rata de citire a fondului,
tg și tf = timpul de citire în minute.

În general, eroarea de citire poate fi diminuată în două moduri: mărind timpul de citire a probelor și alegînd un interval convenabil al activității per probă (tabelele I.2.3. și I.2.4.).

2.3.5. MĂSURAREA RADIOACTIVITĂȚII

Activitaeta oricărui radionuclid se măsoară în *Curie* (Ci) și submultiplii săi sau în Bequerel (Bq) (12).

I. *Unități de măsură. Curie*-ul a fost definit convențional ca acea cantitate de radioizotop care suferă $3{,}7 \times 10^{10}$ dezintegrări atomice pe secundă (dps), sau $2{,}22 \times 10^{12}$dpm. De reținut că această rată a dezintegrării, nu se bazează pe numărul de emisii radioactive sau pe numărul de impulsuri obținut cu



Scanned with OKEN Scanner

Tabelul I.2.3.

Eroarea de citire a unui spectrometru GAMA Packard model 3002, după 7 ani de funcţionare continuă

Experienţa no.	Timp (în minute)	Nr. citiri	Media (nr. pulsuri cumulat)	D.S.	p	CV%
I	0,1	10	85	10	9	12,37
	0,2	10	179	13	13	7,44
	0,5	10	434	21	20	4,95
	1,0	10	877	26	29	2,98
	2,0	10	1 777	45	42	2,55
	5,0	10	4 406	42	36	0,96
II	0,1	10	1 701	52	41	3,05
	0,2	10	3 368	54	58	1,60
	0,5	10	8 548	111	92	1,30
	1,0	10	17 361	102	131	0,59
	2,0	10	34 600	148	186	0,43
	5,0	10	86 918	415	294	0,48
III	0,1	10	1 869	70	43	3,78
	0,2	10	3 742	37	61	1,00
	0,5	10	9 319	106	96	1,14
	1,0	10	18 661	142	136	0,76
	2,0	10	37 325	167	193	0,45
	5,0	10	93 455	435	305	0,47

Tabelul I.2.4

Eroarea de citire în timp de un an (1977) a unui spectrometru GAMA Packard model 3002, după 7 ani de funcţionare continuă

Proba: etalon de ^{137}Cs, T 1/2=30 ani

Luna	Nr. citiri × 10 minute	media p/m	D.S.	CV%
I	5	20 752	53	0,26
II	10	23 109	689	2,98
III	10	22 526	707	3,14
IV	10	22 369	603	2,69
V	10	22 077	897	4,06
VI	5	20 993	202	0,96
VII	5	21 183	209	0,98
VIII	10	21 147	122	0,58
IX	10	20 619	47	0,22
X	10	19 517	97	0,50
XI	10	19 348	80	0,41
XII	10	18 611	40	0,21

ajutorul unui dispozitiv foarte sensibil; ea a fost dedusă din întregul proces prin care atomul instabil atinge starea stabilă.

Subdiviziunile uzuale ale *Curie*-ului sînt:

1 milicurie (mCi) = 0,001 Ci = 10^{-3}Ci
= $3{,}700 \times 10^7$ dps
= 37 MBq

1 microcurie (μCi) $= 0{,}001$ mCi $= 10^{-3}$ mCi sau 10^{-6} Ci
$= 3{,}700 \times 10^{4}$ dps
$= 2{,}22 \times 10^{6}$ dpm
$= 3{,}7 \times 10^{4}$ Bq.

1 nanocurie (nCi) $= 0{,}01\,\mu$Ci $= 10^{-3}\,\mu$Ci
$= 10^{-6}$ mCi
$= 10^{-12}$ Ci
$= 3{,}700 \times 10$ dps
$= 2{,}22 \times 10^{3}$ dpm
$= 37$ Bq

II. *Activitatea specifică* (AS) este cantitatea de radioactivitate pe unitatea de masă de substanţă radioactivă. Aşa cum sînt furnizaţi, radionuclizii pot să nu fie fără purtător (*carrier-free*), adică preparatul s-ar putea să fie sub forma unui amestec de molecule radioactive şi neradioactive. ^{125}I folosit pentru marcarea liganzilor este livrat fără purtător. Activitatea specifică însă nu dă nici o indicaţie asupra concentraţiei elementului chimic.

Activitatea specifică (AS) poate fi exprimată în mCi sau în mega Becquerel (MBq), în rată de dezintegrare (dps sau dpm), sau în rata de citire pe un anumit aparat (p/m sau p/s) per unitate de masă sau de volum (moli, grame, litri). De exemplu, pentru un compus radiomarcat cu structură chimică cunoscută, AS poate fi exprimată în Ci/mM; cînd radionuclidul se află în soluţie dar în concentraţie necunoscută, AS se poate exprima în dpm/ml, iar cînd radionuclidul este sub formă cristalizată, AS se poate da în pulsuri / minut / miligram.

Certificatul de însoţire al ^{125}I folosit pentru marcări, eliberat de furnizor, conţine următoarele: forma chimică — iodură de sodiu în soluţie apoasă la pH=7—9; sub 1% ^{126}I; nu conţine purtător, nici agent reducător, AS ca limite, de exemplu 80—120 mCi/ml şi activitatea totală cu specificarea dată de referinţă, adică data la care factorul de calcul al activităţii este 1,000 (tabelul I.2.5.).

Tabelul I.2.5

Factori de dezintegrare pentru calculul activităţii unei probe de ^{125}I Na în momentul folosirii (The Radiochimical, Centre, Amersham, Anglia)

Zile							
înainte de data de referinţă		*după* data de referinţă					
15	1,189	0	1,000	16	0,831	46	0,588
14	1,175	1	0,989	18	0,812	48	0,575
13	1,162	2	0,977	20	0,794	50	0,562
12	1,149	3	0,966	22	0,776	52	0,549
11	1,136	4	0,955	24	0,758	54	0,536
10	1,123	5	0,944	26	0,741	56	0,524
9	1,110	6	0,933	28	0,724	58	0,512
8	1,097	7	0,922	30	0,707	60	0,500
7	1,084	8	0,912	32	0,691	62	0,489
6	1,072	9	0,901	34	0,675	64	0,478
5	1,059	10	0,891	36	0,659	66	0,467
4	1,047	11	0,881	38	0,644	68	0,458
3	1,035	12	0,871	40	0,630	70	0,445
2	1,023	13	0,861	42	0,616	72	0,435
1	1,011	14	0,851	44	0,602	74	0,425

Scanned with OKEN Scanner

Exemplu numeric: o fiolă cu 0,5 ml soluţie de ^{125}INa cu o activitate de 45 mCi a fost livrată cu data de referinţă 16 iulie 1977 şi sosește la beneficiar la 10 iulie 1977. Factorul de dezintegrare pentru 6 zile înainte de data de referinţă este de 1,072, de aceea în ziua sosirii fiola conţine $45 \times 1{,}072 = 48{,}24$ mCi.

III. *Eficienţa de detectare a aparatului.* Rata de citire nu poate fi estimată direct din AS cînd aceasta este dată în Ci sau în dpm. Pentru a face trecerea de la AS dată în Ci sau în rată de dezintegrare per unitate de masă, trebuie cunoscută eficienţa de detectare a aparatului pentru radioizotopul care ne interesează.

Eficienţa de detectare se determină pe o cantitate cunoscută de radionuclid standard în condiţii cît mai aproape de cele experimentale şi se calculează cu ajutorul relaţiei:

$$\text{eficienţa } \% = \frac{\text{p/s net} - \text{fond}}{\text{dps}} \times 100$$

Diluţia unei soluţii concentrată de radionuclid se calculează din raportul:

$$\frac{\text{p/m dorit}}{\text{p/m în proba nediluată}} = \text{raportul de diluţie,}$$

de exemplu $= \frac{5\,000}{100\,000} = 0{,}05$ deci trebuie să diluăm proba de 20 de ori.

IV. *Timpul de înjumătăţire sau semiviaţa* ($T^1/_2$), este un parametru caracteristic elementelor radioactive şi reprezintă intervalul de timp în care activitatea unui radionuclid ajunge la jumătate din activitatea iniţială.

Modul de dezintegrare poate fi exprimat matematic şi calculat cu ajutorul unei ecuaţii care leagă activitatea de timpul de înjumătăţire şi de intervalul de timp în care a avut loc dezintegrarea. Pe baza acestei relaţii au fost alcătuite tabele (3, 4) pentru calculul $T\ ^1/_2$ şi de asemenea tabele pentru calculul dezintegrării unor anumiţi radionuclizi.

V. *Riscul de iradiere în laboratoarele RIA.* Majoritatea metodelor RIA se efectuează cu doi radionuclizi ^{125}I şi ^{3}H, ca surse deschise.

În laboratoarele RIA, în care determinările se fac cu ajutorul truselor comerciale, consumul este de 2—5 μCi de ^{125}I sau de ^{3}H pentru 100 de probe biologice. Deci un laborator cu o capacitate de 100 de probe pe zi va consuma 2—5 μCi pe zi sub forma compuşilor marcaţi, cu ^{125}I sau cu ^{3}H, în soluţie.

În laboratoarele în care se prepară compuşi marcaţi, consumul lunar este de 5—50 mCi de ^{125}I sub formă de ^{125}INa în soluţie.

Măsurile generale de protecţie în laboratoarele RIA de ambele tipuri sînt cele stabilite prin legislaţiile şi regulamentele naţionale (5, 6). Unele dispozitive ca pipetele automate, distribuitoarele de reactivi automate sau semiautomate, colectoarele de fracţiuni etc., micşorează (nu anulează) riscul de iradiere. Dacă evoluţia unor tehnici de apreciere a reacţiei antigen-anticorp ca de exemplu nefelometria, spectrofotometria, luminometria şi fluorimetria va duce la noi perfecţionări, este posibil ca în viitor să se renunţe treptat, cel puţin pentru unele substanţe, la folosirea compuşilor radiomarcaţi.

Scanned with OKEN Scanner

2.3.6. OBȚINEREA AUTORIZAȚIEI DE LUCRU CU RADIOIZOTOPI

Instituțiile medicale (și nemedicale) care doresc să înființeze laboratoare RIA, cu aprobarea Ministerului de care aparțin, se adresează Comitetului de Stat pentru Energia Nucleară (CSEN), pentru obținerea autorizației. Autorizația se solicită în trei etape succesive: etapa I pentru amplasare, etapa II pentru construcție (în cazul construcțiilor noi) și etapa III pentru solicitarea autorizației de funcționare și a permisului de exercitare (5, 6).

Laboratoarele de lucru cu radioizotopi se numesc unități nucleare, clasificate după activitățile surselor deschise în trei categorii I, II și III, în ordinea crescătoare a radioactivității utilizate (6).

Este obligatoriu ca cel puțin responsabilul laboratorului să fi obținut certificatul de lucru cu radioizotopi, pe baza absolvirii cursurilor pentru utilizarea izotopilor radioactivi (CUIR), cu durata de trei luni, organizate de CSEN.

Organisme internaționale ca Agenția Internațională pentru Energia Atomică (AIEA) cu sediul la Viena, publică periodic, pe baza consultării experților internaționali, recomandări cu privire la aspectele generale de protecție împotriva radiațiilor nucleare (7, 8, 9).

Recomandările OMS (10, 11) prevăd instruirea în domeniul RIA a cadrelor de conducere, precum și a personalului cu studii superioare și tehnic.

2.3.7. EXPUNEREA LA RADIAȚII

Doza de expunere la radiații se exprimă în *rem* (*roentgen equivalent mammal*) sau în submultiplul său m rem.

Roentgen (R) este *unitatea* de expunere și reprezintă cantitatea de radiații X sau gama, care produce în 1,293 mg aer, în condiții normale de temperatură și presiune, ioni de ambele semne, fiecare însumînd o sarcină totală egală cu o unitate electrostatică de sarcină:

$$1R = 2{,}58 \times 10^{-4} \text{ C Kg}^{-1}.$$

Debitul expunerii este raportul dintre expunere și durata ei și se exprimă în R pe secundă:

$$1 \text{ Rs}^{-1} = 2{,}58 \times 10^{-4} \text{ A Kg}^{-1}.$$

Doza absorbită (D) este cantitatea de energie absorbită pe unitatea de masă, de mediul supus unei radiații atomice.

Unitatea de doză absorbită este *rad* (*radiation absorbed dose*) și reprezintă o energie de 100 erg absorbită pe gramul de masă.

$$1 \text{ rad} = 100 \text{ erg g}^{-1} = 0{,}01 \text{ J Kg}^{-1} = 2{,}388 \times 10^{-6} \text{ cal g}^{-1} = 6{,}242 \times 10^{13} \text{ eVg}^{-1}$$

Debitul dozei absorbite este raportul între doza absorbită și durata de iradiere și se exprimă în rad pe secundă:

$$1 \text{ rad s}^{-1} = 0{,}01 \text{ W Kg}^{-1}.$$

Unitatea echivalentă de doză sau, pe scurt, unitatea de doză este *rem* și reprezintă doza absorbită într-un țesut supus la o radiație oarecare, care

Scanned with OKEN Scanner

produce același efect biologic ca o doză absorbită corespunzătoare unei expuneri de un R, determinată de radiații X.

Echivalentul de doză H sau doza, exprimată în rem, se calculează cu ajutorul relației:

$$H = D.Q.N,$$

unde: D = doza absorbită, determinată de radiația utilizată, exprimată în *rad;*

Q = factorul de calitate, corespunzător tipului și energiei radiației utilizate;

N = produsul factorilor de corecție aplicați.

Debitul echivalentului de doză sau debitul dozei este raportul dintre doză și timpul de iradiere și se exprimă în *rem pe secundă.*

Se consideră (4) că o doză de un rem poate fi determinată de:

— o expunere de un R datorată radiației X sau gama;

— o doză absorbită de un rad datorită radiației X, gama sau radiației beta de peste 30 KeV;

— o doză absorbită de 0,6 rad datorată radiației beta sub 30 KeV etc.

Doza maximă admisă pentru expunerea profesională este de 5 000 mrem pe an (sau 100 mrem / săptămînă) pentru organismul întreg (4), doza letală fiind de 500 000 mrem. Pentru 1 μCi de ^{125}I la o distanță de 10 cm, doza de expunere este de 0,006 mrem / oră, pe cînd pentru 1 μCi de ^{131}I la 10 cm doza de expunere este de 0,02 mrem / oră (2).

2.3.8. REGULI DE SECURITATE ÎN LABORATORUL RIA

Riscul extern pentru organismul întreg este foarte improbabil pentru particulele beta deoarece acestea nu pătrund prin piele. Pentru lucrul cu emițători gama (^{125}I) lucrătorul prudent va păstra o distanță cît mai mare de sursă în timpul procedurilor RIA și va recurge la mijloacele uzuale de protecție și de ecranare a sursei în timpul manevrelor de marcare în care se manipulează doze de 0,5—2,5 mCi de ^{125}I.

Regulile de securitate generale, stabilite de organismele naționale (4, 5) sînt respectate și în laboratoarele RIA. Totuși, repetarea lor cu orice ocazie este binevenită:

— în spațiul laboratoarelor RIA nu se prepară, păstrează sau consumă alimente;

— se evită contactul direct al suprafețelor cu radioizotopi prin acoperirea lor cu folii din material plastic;

— cînd, accidental, au fost vărsate soluții radioactive pe suprafețe, se procedează la decontaminarea locului și se raportează persoanei însărcinată cu protecția împotriva radiațiilor în laborator;

— se ține o evidență riguroasă a circuitului materialelor radioactive (recepție, transfer, distribuție etc.);

— tot personalul implicat în lucrul cu radioizotopi poartă casete cu filme sau stilodozimetre;

— dacă soluțiile radioactive sînt volatile, se lucrează sub hotă sau pe cît posibil în containere închise;

Scanned with OKEN Scanner

— orice flacon care conține substanțe radioactive va fi bine închis și codificat corespunzător (izotopul, activitatea);
— lichidele și solidele radioactive se depun în locurile desemnate în acest scop;
— sursele de ^{125}INa destinate pentru marcare se depun în locuri bine asigurate;
— periodic, de exemplu cînd se întrerupe lucrul pentru vacanță, se procedează la controlul contaminării suprafețelor de lucru;
— sticlăria și tot echipamentul susceptibil de contaminare, vor fi corect decontaminate și păstrate în locuri separate de sticlăria și echipamentul cu utilizări generale;
— la terminarea lucrului sau cînd se pleacă din laborator, se spală mîinile și cînd există instrumente de măsură, se face controlul mîinilor.

2.3.9. UTILAREA UNUI LABORATOR RIA

Un laborator RIA destinat determinărilor cu ajutorul truselor comerciale necesită investiții la înființare, periodic fonduri pentru reînnoirea instrumentarului și a pieselor și, anual, un fond pentru achiziția truselor RIA.

Investiția la înființare se ridică la aproximativ 30 000 lei valută și 500 000 lei pentru următoarele echipamente:

aparate:
— spectrometru gama, de preferat cu pasor automat pentru 50—200 probe, computerizat;
— centrifugă cu răcire pentru 100 probe, cu 5 000—10 000 turații pe minut;
— congelatoare electrice pentru minus 20°—40°C;
— frigidere electrice pentru plus 4°—6°C;
— termostat reglabil;
— baie de apă reglabilă;
— etuve.

instrumentar:
— pipete automate pentru microvolume;
— distribuitoare automate pentru microvolume;
— stative din material plastic;
— eprubete din sticlă și din material plastic (polistirenă);
— sticlărie uzuală.

În funcție de volumul de lucru, un cadru cu studii superioare poate supraveghea un laborator cu 5 tehnicieni, fiecare tehnician răspunzînd de una pînă la maximum trei determinări RIA.

Întrucît costul truselor RIA este încă destul de ridicat, adică 10—20 lei valută pentru un rezultat pe o probă biologică, este recomandabil ca pentru determinările solicitate sistematic în număr mare (pentru antigenul hepatitei, hormonii tiroidieni, insulină, angiotensină, digoxină, digitoxină, gonadotrofină corionică, hormonul de creștere, gonadotrofinele hipofizare, testosterona și altele) să se producă truse locale sau naționale.

Laboratoarele destinate producției reactivilor pentru RIA (compuși marcați, antiseruri, preparate de receptori și de tranzine) necesită o utilare mai complexă.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. **Şandru P., Ţopa A.** — Radionuclizii, Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1968.
2. **Lubran M. M.** — Instrumentation in radioimmunoassay, In: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York — Basel, 1977, p. 27.
3. **Ransom J. P.** — Practical competitive binding assay methods, Mosby Company The C. V., Saint Louis, 1976.
4. * * * — Nuclear Chemical and Supplies Catalog Technical Data Section, Downers Grove, Ill., Packard Instruments Co. Inc., 1972, p. 73.
5. * * * — Norme Republicane de Securitate Nucleară: Norme Republicane de Radioprotecţie, CSEN, MS, CNA, 1976.
6. * * * — Norme Republicane de Securitate Nucleară: Regimul de lucru cu surse de radiaţii nucleare, CSEN, 1976.
7. * * * — Safe Handling of Radioisotops, IAEA, Viena, Safety Series, nr. 1, 1962—1973.
8. * * * — Radiation Protection Procedures, IAEA, Viena, Safety Series, nr. 38, 1973.
9. * * * — Medical Supervision of Radiation Workers, Joint publication, WHO, ILO, IAEA, Viena, Safety Series, nr. 25, 1968.
10. * * * — WHO Expert Committee on Biological Standardization, Twenty Sixth Report, Technical Report Series, 565 WHO, Geneva, 1975.
11. * * * — Radioimmunoassay of Hormones for Clinical Trials of Fertility Regulating Agents in Developing Countries, Report of a WHO Meeting of Experts, Technical Report Series, 578, WHO, Geneva, 1975.
12. *** — The SI for the health professions, WHO, Geneve, 1977.

Scanned with OKEN Scanner

3

COMPUȘI MARCAȚI FOLOSIȚI ÎN RIA

În RIA și în metodele similare, substanța supusă marcării este aceeași ca și substanța care este dozată sau ligandul, cu unele excepții cum sînt metodele imunoradiometrice.

În marea majoritate, se folosește marcarea cu ^{125}I dar, uneori, steroizii, prostaglandinele și nucleotidele ciclice se marchează încă cu ^{3}H. Ținînd seama de economicitate, tendința este ca și aceste substanțe să fie marcate, după prealabilă pregătire, tot cu ^{125}I.

3.1. MARCAREA POLIPEPTIDELOR CU ^{125}I

3.1.1. PURITATEA SUBSTANȚEI DESTINATĂ MARCĂRII

Substanțele polipeptidice sînt, fie produse naturale extrase și purificate din țesuturi și lichide biologice, fie produse de sinteză. Și unele și altele sînt similare deși, chimic, nu absolut identice cu substanța nativă. Principalele criterii de selecție sînt similitudinea cu substanța nativă, puritatea și prezența a cel puțin unui nucleu tirozinic per moleculă. (Cu privire la puritate, s-a spus că dacă „marcăm gunoi, vom măsura gunoi".) Cînd gruparea tirozinică lipsește se folosesc procedee de marcare prin conjugare (tabelul I.3.1.). Substanțele destinate marcării pot fi obținute pe cale comercială de la firmele furnizoare; unii hormoni de extracție sînt oferiți gratuit laboratoarelor autorizate de National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases (NIAMDD), National Pituitary Agency (SUA) și de O.M.S. prin intermediul National Institute for Medical Research, Division of Biological Standards, Anglia.

3.1.2. AVANTAJELE ^{125}I

Din anul 1963 este disponibilă sarea de sodiu a ^{125}I care înlocuiește treptat ^{131}I și ^{3}H în procedeele de marcare. Preferința este justificată prin:

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul I.3.1.

Metode de marcare cu ^{125}I

Metodă	Descriere	Evaluare	Bibliografie
Cloramină-T	oxidarea iodurii la iodat și substituția unui H în nucleul tirozinic cu ^{125}I	simplă, rapidă, AS mare, risc de iradiere minim	(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)
Monoclorură de iod	adiția iodului la dubla legătură sau substituția H în nucleul tirozinic cu ^{125}I	cantități mari de proteină, AS moderată	(10, 11, 12, 13, 14)
Electroliză	substituție	timp lung de expunere, AS moderată, în volume mici	(15, 16, 17)
Lactoperoxidază	marcare enzimatică în prezența H_2O_2	blîndă, AS convenabilă, marcarea nedorită a enzimei se evită cu enzimă insolubilizată	(18, 19, 20, 21, 22, 23, 24)
Agent acilant marcat cu ^{125}I	marcarea prin metoda cu cloramină T a unui agent acilant și cuplarea acestuia cu proteina	menajează molecula peptidică, utilă pentru molecule fără tirozină (parathormon, secretina)	(25, 26)

1) $T^1/_2$ convenabil (60 zile), ceea ce scutește laboratorul de preparări frecvente ale compusului marcat; 2) risc de iradiere redus (toxicitate medie); 3) abundența izotopică de 90—98% (față de 20—25% pentru ^{131}I); 4) eficiența de numărare a impulsurilor mare, aceasta fiind proporțională cu abundența fotonică și invers proporțională cu energia radiațiilor emise (^{125}I produce 100 fotoni per 100 dezintegrări față de 80, produși de ^{131}I iar energia este de 0,035 MeV pentru ^{125}I față de 0,36 pentru ^{131}I).

Soluția de ^{125}INa utilă pentru marcarea proteinelor, polipeptidelor și a haptenelor cuplate cu tirozină se poate obține pe cale comercială de la Radiochemical Centre Amersham Anglia, de la Medimpex — Ungaria, de la Centrul pentru distribuția radioizotopilor, Swierck — Polonia etc., prin intermediul Chimimport — R.S.R. Soluția livrată trebuie să îndeplinească următoarele condiții: radioactivitate de peste 80 mCi/ml și să nu conțină purtător sau agent reducător.

3.1.3. METODA DE MARCARE CU CLORAMINA T

Este redată schematic în figura I.3.1. Eficiența marcării este dependentă de respectarea cîtorva aspecte tehnice:

— randamentul marcării crește cu creșterea concentrației proteice;

— tamponul de electție este tamponul fosfat;

— pH-ul optim este aproximativ 7 (pH-ul alcalin favorizează marcarea și a altor aminoacizi);

— volumul de reacție este necesar să fie cît mai mic;

— timpul de contact al reactanților este critic, putînd duce la o încorporare excesivă a iodului în molecula proteică;

Scanned with OKEN Scanner

— metabisulfitul de Na adăugat în volum mare (200—300 µl) reduce alterarea substanţei marcate;

— întreruperea reacţiei se poate face şi cu proteine (ser sanguin, albumină) în concentraţie mare.

În ţara noastră se efectuează marcări cu ^{125}I în următoarele instituţii: Institutul de endocrinologie, Institutul „Victor Babeş", Institutul de virusologie, Institutul oncologic — Bucureşti, Centrul pentru producţia radioizotopilor — IFIN, I.M.F. Timişoara, I.M.F. Cluj-Napoca, Catedra de biochimie, Timişoara.

3.1.4. SURSE DE EŞEC ALE RADIOIODURĂRII

(i) iodură radioactivă veche; (ii) concentraţia redusă a proteinei (de exemplu hormoni de sinteză livraţi în soluţii diluate); (iii) prelungirea timpului de contact al reactanţilor.

3.1.5. VERIFICAREA PURITĂŢII SUBSTANŢEI MARCATE

Cercetările de puritate sînt fizico- şi imuno-chimice:

— precipitarea cu acid tricloracetic, pentru polipeptide cu GM peste 5 000;

— adsorbţia pe cărbune-dextran;

— migrarea în cîmp electric pentru polipeptide mari;

— cromatografia pe hîrtie sau gel de siliciu pentru peptide mici;

— reactivitatea imunochimică cu antiser specific în exces.

3.1.6. CALCULUL ACTIVITĂŢII SPECIFICE (AS)

AS a substanţei marcate purificată prin cromatografie pe Sephadex, celuloză etc., poate fi determinată, fie estimativ, din precipitarea cu TCA, fie calculată după formula (24):

$$ng\ {}^{*}H = ng\ H \frac{B}{Bo - B}$$

Dacă se introduc într-un sistem radioimunologic reactivii după schema:

Tampon µl	H (standard) µl	Ac µl	*H µl	%
300	—	100	100	Bo=50
200	100 (2 ng)	100	100	B=20

atunci avem:

$$ng\ {}^{*}H = 2 \frac{20}{50 - 20} = 2.0{,}6 = 1{,}2\ ng$$

Ştiind că am introdus în sistem 100 µl *H care au dat 10 000 p/m deci 100 000 p/m/ml şi că 1 µCi de ^{125}I are 500 000 plm, rezultă că 1 ml de *H are o radioactivitate de 0,2 µCi. Aşadar, avem 0,2 µCi per 1,2 ng *H, de unde rezultă AS=166 µCi/µg.

Scanned with OKEN Scanner

3.1.7. CONSERVAREA COMPUSULUI MARCAT

Polipeptidele suferă degradări în timpul marcării, porţiunile degradate putînd fi îndepărtate prin procedeul de purificare pe coloane de gel de dextran. Condiţiile de conservare sînt diferite pentru firmele producătoare care preferă liofilizarea favorabilă transportului la distanţă, pe cînd în laborator, congelarea sub —20°C în soluţii tampon albuminate asigură stabilitatea marcatului timp de 2—6 săptămîni. În timpul conservării, concentraţia radioactivităţii nu trebuie să depăşească de 5—10 ori concentraţia de lucru. În timpul lucrului, compusul marcat este conservat la +4°C, unde rămîne stabil 7—10 zile.

Sursele degradării hormonului sînt numeroase.

(i) În timpul procedurilor de marcare:
- substituţia excesivă a H cu I
- iradierea
- atacul chimic al reactanţilor şi al impurităţilor din soluţia radioactivă.

(ii) În timpul conservării:
- autoiradierea sau „catastrofa de dezintegrare"
- radioliza
- îngheţul şi dezgheţul repetat mai mult de două ori.

(iii) În timpul incubării:
- temperatura
- atacul enzimatic.

Degradarea în timpul conservării şi incubării poate fi redusă, folosind concentraţii crescute de albumină (2—10 g/l) sau inhibitori enzimatici ca trasylol sau acid 6-aminocaproic. Nu toate substanţele marcate sînt la fel de susceptibile de degradare, printre cele mai stabile fiind insulina, pe cînd glucagonul, parathormonul sau TSH devin instabile după marcare.

3.2. MARCAREA SUBSTANŢELOR NEPEPTIDICE CU ^{125}I

Derivaţii rezultaţi din conjugarea tirozinei cu o haptenă (steroizi, medicamente, glicozizi cardiaci, prostaglandine) (27, 28, 29) permit marcarea cu ^{125}I după procedeele uzuale.

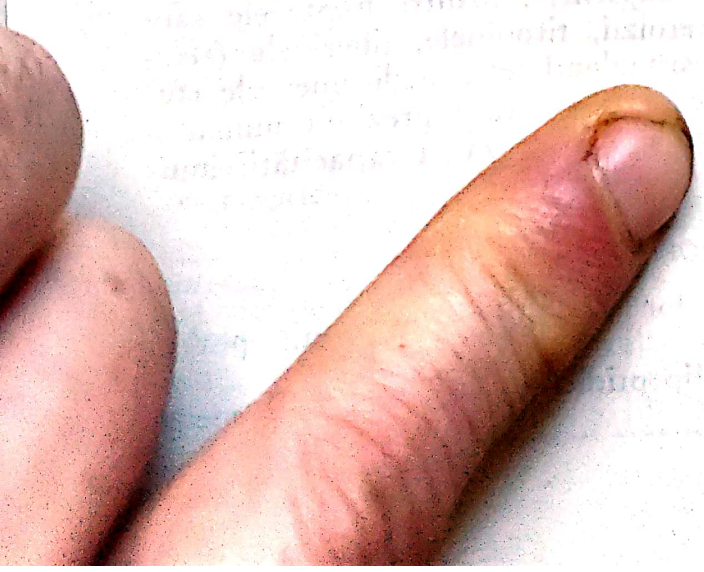
În acest fel, determinările RIA devin mai economice, folosirea lichidului de scintilaţie şi a fiolelor speciale fiind evitată. Nici aparatura specială pentru detectarea şi măsurarea emiţătorilor beta nu mai este necesară.

BIBLIOGRAFIE

1. **Hunter W. M., Greenwood F. C.** — Nature (Lond.), 1962, *194*, 455.
2. **Greenwood F. C., Hunter W. M., Glover J. S.** — Biochem. J., 1963, *89*, 114.
3. **Hunter W. M.** — In: „Handbook of experimental immunology" (editat de D. M. Weir), Sci. Publ., Oxford, Edinburg, 1967, p. 608.
4. **Greenwood F. C.** — In: „Modern trends in endocrinology", Butterworths, and Co. (Publishers) Ltd. Londra, 1967, vol. 3, p. 286.
5. **Greenwood F. C.** — In: „Principles of competitive proteinbinding assays" (editat de W. D. Odell şi W. H. Daughaday), Lippincott, Co. J. B., Philadelphia — Toronto, 1971, p. 288.

Scanned with OKEN Scanner

6. **Simionescu L., Stamatescu R.** — Stud. Cercet. Endocr., 1971, *22*, 57.
7. **Cerceo E.** — Analyt. Chem., 1973, *45*, 93.
8. **Hunter W. M.** — Brit. med. Bull., 1974, *30*, 18.
9. **Balaban A., Gălăţeanu I., Simionescu L., Georgescu G.** — Compuşi marcaţi şi radiofarmaceutici în medicină, Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1979.
10. **McFarlane A. S.** — Nature (Lond.), 1958, *182*, 53.
11. **Helkamp R. W., Goodland R. L., Bale W. F., Spar I. L., Mutschler I. E.** — *Cancer Res.*, 1960, *20*, 1 493.
12. **Bale W. F., Helkamp R. W., Davis T. P., Izzo M. J., Goodland R. L., Contreros M. A., Sear I. L.** — Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N. Y.), 1966, *122*, 407.
13. **Helkamp E. W., Contreros M. A., Izzo M. J.** — J. Appl. Rad. Isot., 1967, *18*, 747.
14. **Helkamp R. W., Contreros M. A., Bale W. F.** — J. Appl. Rad. Isot., 1967, *18*, 737.
15. **Rosa U., Scassellati G. A., Pennisi F., Riccini N., Giagnoni P., Giordani R.** — Biochem. Biophys. Acta., 1964, *86*, 519.
16. **Rosa U., Pennisi F., Bianchi R., Federichi G., Donato L.** — Biochem-Biophys. Acta., 1967, *133*, 486.
17. **Pennisi F., Rosa U.** — J. Biol. Nucl-Med., 1969, *13*, 64.
18. **Marchalonis J. J.** — Biochem. J., 1969, *113*, 299.
19. **Morrison M., Bayse G. S.** — Biochemistry, 1970, *9*, 2 995.
20. **David G. S.** — Biochem. Biophys. Res. Comm., 1972, *48*, 464.
21. **Miyachi Y., Vaitukaitis J. L., Nilschlag E., Lipsett M. B.** — J. clin. Endocr., 1972, *34*, 23.
22. **Lambert B., Jacquemuire C.** — Biochemie, 1973, *55*, 1 395.
23. **Mclliney J., Schulster D.** — Endocrinology, 1974, *94*, 1 259.
24. **Ransom J. P.** — Practical competitive binding assay methods, Mosby Company, The C. V. Saint Louis, 1976.
25. **Bolton A. E., Hunter W. M.** — Biochem. J., 1973, *133*, 529.
26. **Rudinger J., Ruegg U.** — Biochem. J., 1973; *133*, 538.
27. **Erlanger B. F., Borek F., Beiser S. M., Lieberman S.** — J. biol. Chem., 1957, *228*, 713.
28. **Erlanger B. F., Borek F., Beiser S. M., Lieberman S.** — J. biol. Chem., 1959, *234*, 1 090.
29. **Erlanger B. F.** — Pharmacol. Rev., 1973, *25*, 271.



Scanned with OKEN Scanner

4

COMPONENTELE REACȚIEI DE TIP ANTIGEN-ANTICORP

4.1. ANTIGENE, HAPTENE ȘI IMUNOGENE

Antigen, în sens larg, este orice substanță care determină apariția unor reacții imunitare (celulare și umorale) în organism.

În sens restrîns, antigenul este o substanță care, introdusă în organism, incită formarea anticorpilor cu care reacționează specific.

Termenul de *imunogen* este folosit adesea în locul celui de antigen și invers. Există tendința de a fi considerați ca noțiuni distincte. Se precizează că *antigenicitatea* unei substanțe reflectă caracteristicile serologice *in vitro* ale antigenului, pe cînd *imunogenicitatea* se referă la capacitatea unei substanțe de a induce formarea anticorpilor la un animal (1).

Cele mai cunoscute caracteristici ale imunogenului sînt xenicitatea (reprezintă ceva *străin*) față de componentele animalului inoculat și talia moleculară suficient de mare, astfel încît să conțină un număr adecvat de structuri inductoare de anticorpi denumite determinante antigenice. Imunogene pot fi orice substanțe naturale (proteine, polizaharide, nucleoproteine, lipoproteine) sau polipeptide sintetice cu GM peste 1 000.

Moleculele mici nu sînt imunogene prin ele însele; ele devin imunogene prin cuplare cu o moleculă mai mare și sînt capabile să reacționeze *in vitro* cu anticorpul corespunzător — acestea sînt *haptenele*. Printre haptenele care prezintă interes pentru RIA se numără steroizii, tironinele, liberinele (*releasing* factorii sau hormonii hipotalamici), prostaglandinele, medicamentele etc.

Depărtarea față de specie și greutatea moleculară reprezintă numai o parte din contextul condițiilor care coroborează la realizarea capacității imunogene a unei substanțe (tabelul I.4.1.).

4.1.1. IMUNOGENE HORMONALE

Din punct de vedere al capacității lor imunogene, hormonii pot fi clasificați în trei categorii:

— hormoni proteici, proteidici și polipeptidici, care sînt imunogene și antigene complete sau tipice;

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul I.4.1.

Condiţii pentru realizarea capacităţii imunogene a unei substanţe

Caracteristici ale imunogenului şi gazdei	Condiţia
Specificitatea de specie	Cît mai depărtată de specia la care se inoculează
Natură chimică	Proteine, polipeptide mari, polizaharide
Greutatea moleculară	Minimum 1 000
Structura internă	Fixă
Configuraţia spaţială	Rigidă, stabilă
Doza	Adecvată: netolerogenă, neparalizantă
Difuziunea în organism	Remanenţă suficientă: solubilitate mică sau înglobare în adjuvant
Locul de inoculare	Să permită antrenarea largă a sistemului limfoid
Capacitatea imunoreactivă a gazdei (animalului)	Pregătire prin inocularea unor stimulatori imunitari nespecifici

— hormoni steroizi şi tironine, care devin imunogene numai prin cuplare cu un imunogen;

— oligopeptide naturale (care pot fi imunogene) şi de sinteză (care au funcţie de haptenă).

În tabelul I.4.2. este prezentată clasificarea hormonilor peptidici umani după criteriul greutăţii moleculare.

Tabelul I.4.2.

Clasificarea hormonilor peptidici umani după greutatea lor moleculară

Categoria	Hormonul sau substanţa hormonoidă	Nr. resturi aminoacizi	GM
Oligopeptide			
1—10 peptide			
GM 100—1 000			
mono- şi	MIT, DIT, T_3, T_4	2	
dipeptide			
tripeptide	TRH	3	362
tetrapeptide			
pentapeptide			
hexapeptide			
heptapeptide			
octapeptide	oxitocina	8	1 007
	angiotensina II		
	vasopresina		
	bradikinina	9	
nonapeptide	angiotensina I		
decapeptide	gonado-liberine (LH/FSH-RF)	10	
Polipeptide			
11—50 peptide		13	
GM 1 100—5 000	α-MSH	14	
	SRIF	17	
	gastrina II (porcină)	27	
	secretina (porcină)		

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul I.4.2. (continuare)

Categoria	Hormonul sau substanţa hormonoidă	Nr. resturi aminoacizi	GM
	glucagon (porcin)	29	3 800
	TCT (tirocalcitonina)	32	3 700
	pancreozinina		
	colecistochinina	33	
	ACTH	39	4 570
Macropeptide 51—100 peptide GM 5 000—50 000			
	Insulina	51	5 734
	Parathormon (Pth)		8 500
	HGH (hormon de creştere uman)	188	21 500
	TSH		25 000
	LH		26 000
	FSH		30 000
Megapeptide >100 peptide GM>100 000	tiroglobulina		660 000

4.1.2. SPECIFICITATEA DE SPECIE

Majoritatea hormonilor polipeptidici şi macropeptidici umani sînt diferiţi, ca structură chimică, de hormonii endogeni ai iepurelui şi caprei, animale folosite cel mai frecvent pentru imunizare. Cu toate acestea, exceptînd hormonii proteici, imunizarea cu hormoni glicoproteici hipofizari sau placentari necesită multe insistenţe pentru a obţine antiseruri convenabile.

De remarcat însă că, uneori, similitudinea structurală poate fi avantajoasă din alt punct de vedere. Mulţi hormoni macropeptidici umani sînt greu de obţinut în special din cauza materiei prime (ţesutul glandular) insuficiente. De aceea, pentru obţinerea antiserurilor au fost folosiţi omologii lor izolaţi de la acele mamifere cu care există asemănările moleculare cele mai extinse. De exemplu, insulina porcină, care diferă de cea umană numai printr-un singur reziduu peptidic, este folosită curent pentru imunizare şi ca radioligand în sistemul RIA; numai preparatul de referinţă este din sursă umană. Deci sistemul de dozare a insulinei umane prin metoda RIA este un sistem mixt: heterolog şi omolog. Asemănarea structurală dintre TSH şi Pth uman şi hormonii corespunzători bovini, a permis construirea unor sisteme RIA mixte sau chiar heterologe.

În tabelele I.4.3. şi I.4.4. sînt prezentate aspecte legate de specificitatea de specie şi de organ a hormonilor şi comunităţi structurale ale hormonilor umani cu cei ai unor mamifere.

4.1.3. RELAŢIA STRUCTURĂ BIO- ŞI IMUNOACTIVĂ

Principala obiecţie adusă sistemelor RIA este aceea că metoda măsoară porţiuni moleculare imunoactive care pot să nu coincidă cu cele bioactive. În acest sens, cîteva întrebări sînt pe cale de a-şi găsi răspunsul, în mare parte datorită metodelor RRA:

— care este porţiunea bioactivă a unei molecule hormonale?

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul I.4.3

Specificitatea de specie și de organ a hormonilor

Sursa	Hormonul	Specificitatea	
		Specie	Organ
Hipotalamus	Liberine (*releasing* factori)	—	±
Epifiza	AVT (arginin-vasotocina)	—	?
Hipofiza	HGH	+ (primate)	+
	TSH	± (rx cu TSH bovin)	+ (dar și în placentă)
	ACTH	± (rx cu ACTH porcin)	+
	LH	+ (rx slabe cu omologii ovini)	—
	FSH	+ (rx slabe cu omologii ovini)	—
	Prolactina	+	—
	Oxitocina	—	+
	Vasopresina	—	+
Tiroida	Tironine (DIT, T_3,T_4)	—	+
	Tiroglobulina (precursor)	±	+
	TCT (Tirocalcitonina)	±	+
Paratiroida	Parathormon	±	+
Pancreasul	Insulina	±	+
	Glucagon	±	— (și enteroglucagon)
Placenta	HCG	+	+
	HPL	+	+
CSR+gonade	Steroizi sexuali	—	—
	Mineralo- și glucocorticoizi	—	—

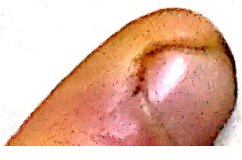
(—) absența specificității; (±) specificitate dominantă pentru o specie sau un organ, putînd fi prezenți și în alte structuri; (+) specificitate strictă; rx = reacție încrucișată.

— în ce zone ale moleculei sînt distribuite determinantele antigenice?

— cîte grupări imunoactive are fiecare hormon în molecula sa și cîți aminoacizi cuprinde o grupare?

— care este relația intramoleculară dintre structura bioactivă și cea imunoactivă?

Studiul detaliat al unor hormoni polipeptidici, în special al celor obținuți pe cale sintetică, a dus la concluzia că porțiunea aminoterminală a lanțului polipeptidic deține capacitățile hormonale (oxitocina, ACTH) (2, 3, 4). Această porțiune este, fie identică (ACTH), fie foarte asemănă-



Scanned with OKEN Scanner

Tabelul I.4.4.

Comunităţi structurale ale unor hormoni polipeptidici umani cu omologii lor de la alte mamifere

Hormonul	Nr. reziduuri aminoacizi/moleculă		Nr. poziţii aminoacizi comuni cu hormonul uman	Nr. poziţii aminoacizi diferiţi în porţiunea	
	la om	la alte specii		N-terminală	C-terminală
ACTH	39	porc =39	24 (1—24)	0	1
		oaie =39	24 (1—24)	0	5
		bou =39	24 (1—24)	0	6
TCT	32	porc =32	10	9	13
		bou =32	10	9	13
		somon =32	16	7	9
Gastrina I	17	porc gastrina I =17	16	1	0
II	17+SO_3H poziţia 12	oaie gastrina I	16	1	0
		cîine gastrina I	16	1	0
Pth	—	bou =84	77 comuni bou şi porc	4	3
		porc =84			
Insulina	51	porc =51	50		
		bou =51	49		

toare (calcitonina, MSH) ca secvenţă de aminoacizi, la multe specii de mamifere inclusiv omul (tabelul I.4.4.).

Dacă se ţine seama că diferenţele de structură dintre hormonii diferitelor specii apar mai ales în porţiunea C-terminală a moleculei lor (tabelul I. 4.4.), s-ar putea conchide că tocmai aici sînt plasate grupările determinate antigenice. Această porţiune ar asigura individualitatea hormonului în interacţiunea cu celula imunocompetentă care ar prelua informaţia structurală.

Într-adevăr, anticorpii faţă de molecula hormonală intactă nu dau reacţii încrucişate cu hormonii altor specii, dacă hormonul cu care au fost inoculate animalele are specificitate strictă de specie (de exemplu HGH) sau dau reacţii încrucişate parţiale, dacă există comunităţi antigenice suficiente (de exemplu insulina). Dar, dacă porţiunea bioactivă este separată, prin procedee chimice, de restul moleculei, sau este preparată prin sinteză, ca de exemplu secvenţa 1—24 a ACTH, această porţiune, care este cea N-terminală a moleculei intacte, va produce anticorpi care reacţionează încrucişat cu hormonii tuturor speciilor care o sintetizează. Rezultă că şi porţiunea N-terminală bioactivă conţine grupări determinante antigenice şi că imunogenicitatea şi antigenicitatea sînt proprietăţi cu distribuţie intramoleculară mult mai largă decît bioactivitatea.

Aceste aspecte au largi implicaţii practice, întrucît antiserurile obţinute prin inocularea moleculei intacte pot evidenţia, în sistemele RIA, fragmente hormonale biologic inactive. Un exemplu este RIA—ACTH cu antiseruri care recunosc mai ales porţiunea C-terminală biologic inactivă.

Scanned with OKEN Scanner

Ideale pentru sistemele RIA, sînt antiserurile strict specifice (monospecifice), dotate cu afinitate mare pentru antigenul sau haptena corespunzătoare. Variabilitatea de răspuns a animalelor la același antigen, în aceleași condiții de inoculare, face ca asemenea antiseruri să fie obținute rar. Multe din lucrările care recomandă scheme de imunizare, statistic infailibile, în general sînt considerate simple „anecdote" (5). Rezultă că pentru a crește probabilitatea unui antiser adecvat trebuie inoculate multe animale și aplicată o varietate de strategii de imunizare (6) (tabelul I.4.5.).

Tabelul I.4.5

Căi și forme de inoculare ale imunogenului

Calea de inoculare	Forma de administrare	avantaje/dezavantaje	Rezultate
intravenos	solubilă	metabolizare rapidă, risc de șoc la rapel	mediocre
intraperitoneal	adsorbit pe microparticule	metabolizare rapidă	mediocre
subcutanat	înglobat în adjuvant	—	mediocre
intramuscular		dureros pentru animal	bune
intraplantar		necesită intervenție chirurgicală, ganglionii se pot necroza	bune
intraganglionar		necesită deschiderea chirurgicală a abdomenului	bune
intrasplenic		animalele suportă bine, suficiente doze mici de imunogen: 0,2—1 mg/doză inclusiv animale mari	foarte bune
intradermic în multiple locuri			

Menționăm că, în ultimii ani, se prepară anticorpi monoclonali anti-hormoni prin metoda hibridării (46).

I. *Forma de inoculare a imunogenelor hormonale.* Imunogenele hormonale pot fi produse naturale, obținute prin procedee de extracție și de purificare sau produse de sinteză chimică. Acestea sînt administrate ca molecule intacte sau ca fragmente ale lor: subunitățile beta ale LH, FSH, HCG sau lanțuri polipeptidice A și B ale insulinei.

Puritatea imunogenului de extracție este de dorit dar nu este totdeauna posibilă. În preparatele de sinteză pot apare unele peptide „aberante", care generează dificultăți, de aceea este necesar să fie controlate.

Forma de administrare: și imunogenele naturale și cele sintetice pot fi administrate fie sub formă solubilă, fie insolubilizate, fără restricții de pH.

II. *Forma de inoculare a haptenelor hormonale și nehormonale.* Pentru a le face imunogene, haptenele sînt cuplate cu o proteină. Numărul de molecule de haptenă atașat moleculei de proteină (numărul de substituții) este important, deși nu s-a putut stabili o corelație între numărul de substituții și titrul antiserurilor (7). Specificitatea antiserurilor depinde și de orientarea haptenei față de molecula proteică, anticorpul generat de complexul haptenă-proteină avînd tendința să recunoască acea parte a moleculei de haptenă care este plasată la distanța cea mai mare de locul de conjugare cu proteina purtătoare (5).

III. *Metodologia cuplării haptenelor cu o proteină* are în vedere considerente care privesc haptena (natura sa chimică, zonele sale specific bioactive) şi considerente care privesc molecula purtătoare (imunogenitatea, prezenţa locurilor de legare cu haptena).

Legătura chimică dintre haptenă şi suportul proteic trebuie să fie o legătură de tip *covalent* (legătură chimică ireversibilă), altfel apar disocieri ionice şi imunizarea faţă de haptenă este suprimată.

Tehnicile de sinteză a conjugatelor haptenă-proteină au la bază lucrarea lui Erlanger şi colab. (8). Numeroasele lucrări care au fost publicate ulterior privesc modificări şi adaptări în funcţie de natura şi structura chimică a haptenei şi de specificitatea scontată. Experienţa în domeniul conjugatelor steroizi-proteine este prezentată în cîteva lucrări de sinteză (9, 10, 11).

După modele similare sînt preparate şi conjugatele cu proteine ale nucleotidelor ciclice, prostaglandinelor, drogurilor etc.

Oligopeptidele naturale şi de sinteză pot fi administrate şi sub formă insolubilizată prin adsorbţie pe microparticule inerte (polimeri, cărbune).

Seruri anti-T_3 pot fi obţinute prin inocularea directă a prohormonului — tiroglobulina — extrasă din tiroide umane prelevate chirurgical de la bolnavi cu boala Basedow.

4.2. ANTICORPII

Sînt substanţe proteice sau proteide (glicoproteine) care se formează în organism în urma stimulării sistemului reticulohistiocitar cu un imunogen şi reacţionează caracteristic *in vitro* cu substanţa care i-a produs. Reacţia cu alte substanţe în afara celei care a indus răspunsul imunitar se numeşte *reacţie încrucişată.*

Mecanismul formării anticorpilor este complex şi încă insuficient clarificat (12). Stimulul imunogen duce la două categorii de răspuns imunitar: celular şi umoral. Pentru metodologia RIA, numai răspunsul umoral prezintă interes.

Anticorpii din serul unor oameni sau animale pot reacţiona specific cu anumite antigene în absenţa oricărei expuneri cunoscute la antigen. Aceştia sînt *anticorpii naturali* cum sînt de exemplu anticorpii anti-hematii de oaie observaţi frecvent la om.

Există şi excepţii de la regula că imunogenul trebuie să fie străin de specia la care se induc anticorpi. Acestea sînt stările patologice, în care se formează anticorpi faţă de constituenţii proprii, numiţi autoanticorpi, care apar ca urmare a unei defecţiuni în mecanismul de recunoaştere a ceea ce este propriu (*self*-ul). Un exemplu sînt autoanticorpii antitiroglobulină observaţi în boala Hashimoto.

4.2.1. CARACTERISTICI FIZICO-CHIMICE

Încă de la începutul acestui secol a fost stabilită natura proteică a anticorpilor şi caracterul lor de globulină. Pe baza migrării electroforetice, globulinele din ser au fost clasificate în α-, β şi γ-globuline; globulinele anticorp migrează cu toate aceste fracţiuni dar mai ales cu γ-globulinele. Anticorpii sînt numiţi cu un termen general imunoglobuline, prescurtat Ig, iar

Scanned with OKEN Scanner

imunoglobulinele γ-IgG. Stimulul imunogen determină creşterea cantităţii IgG din ser (fig. I.4.1.). Criteriul unor particularităţi structurale a stat la baza clasificării Ig în cinci clase: IgG, IgA, IgM, IgD şi IgE în ordinea descrescătoare a concentraţiei lor în ser.

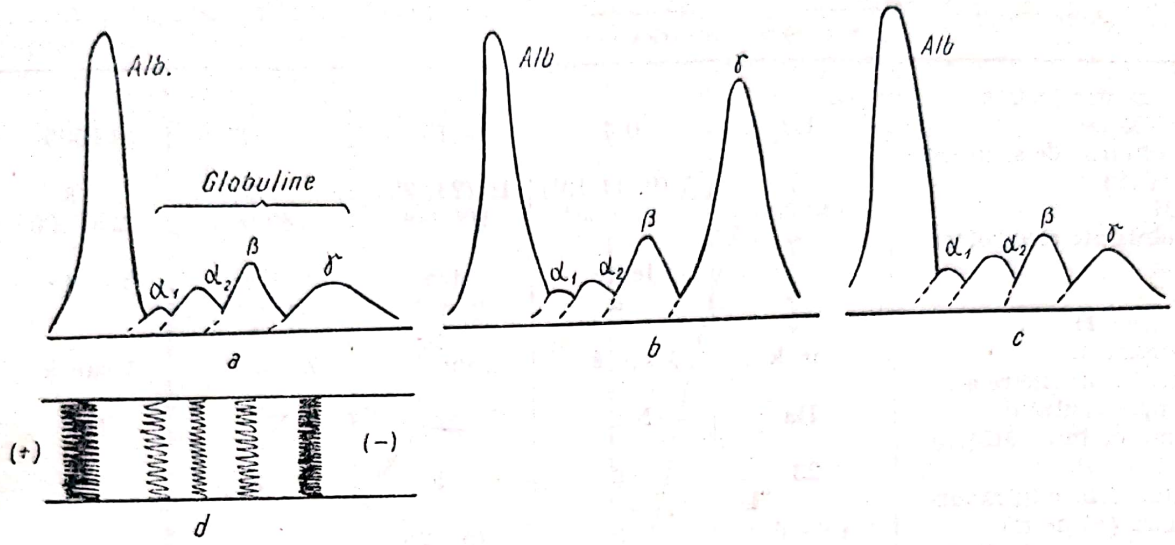


Fig. I.4.1. Asocierea activităţii anticorp cu fracţiunea gamaglobulinică din ser: *a*) electroforeza serului unui animal înainte de imunizare; *b*) electroforeza serului aceluiaşi animal după hiperimunizare; *c*) electroforeza serului de la animalul hiperimunizat, după absorbţia cu antigenul corespunzător; *d*) benzile electroforetice obţinute cu serul înainte de imunizare.

Ig sînt proteine policatenare (13), alcătuite din două lanţuri polipeptidice cu greutate moleculară (GM) şi secvenţe ale aminoacizilor diferite: lanţul greu (*Heavy*=H) cu GM mare şi lanţul uşor (*Light*=L), cu GM mică. Diferenţa între cele cinci clase de Ig este dată mai ales de secvenţa diferită a aminoacizilor din lanţul H, clasa fiind notată prin literele greceşti corespunzătoare IgG (γ), IgM (μ), IgA (α), IgD (δ) şi IgE (ε). Lanţurile L sînt şi ele de două tipuri: tipul lambda (λ) şi tipul Kappa (K), care nu coexistă niciodată în aceeaşi moleculă de Ig.

Componenta majoră a fracţiunii anticorp din antiserurile folosite în sistemele RIA este clasa IgG cu GM de aproximativ 150 000 şi coeficient de sedimentare 7S (tabelul I.4.6), formată mai ales după inoculări repetate (răspuns secundar), dar şi la stimulul primar şi în mai mică măsură din IgM, formate în timpul stimulului primar şi mai puţin în cel secundar.

Molecula IgG este alcătuită din cîte două perechi de lanţuri H şi L unite prin punţi disulfidice în ordinea L-H-H-L.

Moleculele de IgG au fost clasificate, pe baza unor particularităţi ale secvenţei aminoacizilor şi GM a lanţurilor H, în patru subclase IgG_1, IgG_2, IgG_3 şi IgG_4 (cu lanţurile γ_1, γ_2, γ_3 şi γ_4), în ordinea descrescătoare a concentraţiei lor serice (75, 15, 7 şi respectiv 3%).

În lanţurile H şi L există cîte două zone: variabilă (V) şi constantă (C).

4.2.2. DISOCIEREA ENZIMATICĂ A IgG

Tratarea enzimatică cu *papaină* a moleculei de IgG o disociază în trei fragmente: două fragmente F_{ab}, care leagă antigenul dar nu-l precipită, şi un fragment cristalizabil F_c, care dă reacţia de fixare a complementului şi face transferul transplacentar.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul I.4.6.

Caracteristici fizicochimice, imunochimice şi fiziologice ale imunoglobulinelor umane (1)

Proprietatea	Clasa de imunoglobuline (Ig)				
	IgG (γG)	IgA (γA)	IgM (γM)	IgD (γD)	IgE (γE)
Concentraţia în ser (g/100 ml)	1,2	0,4	0,12	0,003	0,0005
Coeficient de sedimentare (S)	7	7 (9, 11,13[1])	19 (24, 32)	7	8
GM	140 000	160 000[2]	900 000	180 000	200 000
mobilitate electroforetică	γ	β lente	între γ şi β	între γ şi β	β lente
Lanţuri H	γ	α	μ	δ	ε
Lanţuri L	λ sau k	λ sau k	λ sau k	λ sau k	λ sau k
Reacţia de fixare a complementului	Da	Nu	Da	Nu	Nu
Timp de înjumătăţire (T 1/2) zile	23	6	5	3	?
Catabolizare intravasculară (% pe zi)	4,6 – 6,9	?	15 – 25	?	?
Procent de hidraţi de carbon	3	10	10	?	10
Activitate anticorp	majoritatea Ac.[3] la infecţii; majoritatea Ac. răspunsului secundar; izoaglutinine Rh; factorul LE	Prezente în secreţii externe	Ac. răspunsului primar (primul Ac. format); izoaglutinine ABO; factor reumatoid	Activitate anticorp rar demonstrată	Reagine

[1]) parantezele arată existenţa polimerilor;
[2]) IgA seric: GM = 160 000; IgA secretor: GM = 350 000;
[3]) Ac = anticorp

Digestia enzimatică cu *pepsină* scindează molecula de IgG în două fragmente similare cu F_{ab} numite $F(_{ab'})_2$, care fiind unite, sînt bivalente şi dau reacţii de precipitare cu antigenul.

Studii la microscopul electronic ale reacţiei fragmentelor bivalente cu haptena au arătat forma „în Y" a moleculelor anticorp, cu formarea unor polimeri (dimeri, trimeri, tetrameri şi pentameri) şi forma „în T" a anticorpilor în afara reacţiei cu haptena. De aceea, în unele publicaţii asupra metodelor RIA, anticorpul este figurat în forma Y.

4.2.3. LOCUL *SITUS*-UL) DE COMBINARE ŞI VALENŢA ANTICORPILOR

Locul de combinare al antigenului cu anticorpul se numeşte determinant antigenic, iar zona moleculară a anticorpului care leagă determinantul se numeşte loc sau *situs* de combinare.

Deşi metodele chimiei şi imunologiei au permis alcătuirea unor modele coerente ale structurii IgG, locul de combinare cu antigenul este încă obiect de studiu şi de controverse. El a fost localizat intercatenar în fragmentul

Scanned with OKEN Scanner

F_{ab}. Se pare că *afinitatea* pentru antigen necesită integritatea fragmentului F_{ab}, separarea catenelor reducînd afinitatea, nu şi *specificitatea*.

Valenţa anticorpilor indică numărul de locuri de combinare dintr-o moleculă de anticorp. Experienţele au arătat (poate provizoriu) că molecula de IgG posedă două *situs*-uri de combinare, deci numărul de valenţă este

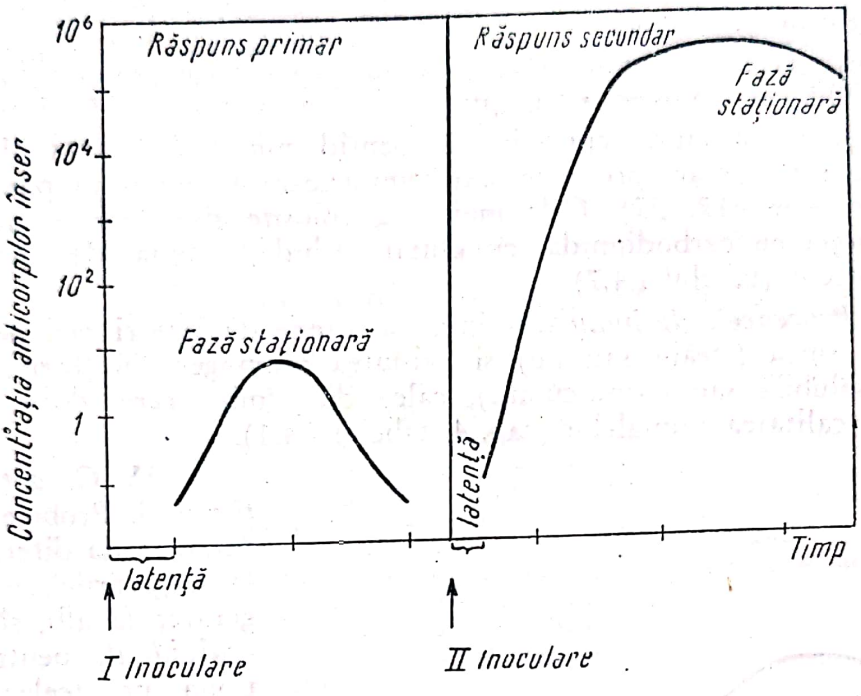


Fig. I.4.2. Reprezentare schematică a fazelor de debut ale răspunsului imunitar-umoral. Ramura ascendentă a curbelor prezintă o creştere exponenţială a concentraţiei anticorpilor în ser.

doi. Printre metodele folosite pentru determinarea numărului de valenţă este metoda dializei la echilibru, care este utilă şi pentru măsurarea constantei de asociere dintre anticorp şi haptena specifică (14).

În domeniul arhitecturii şi proprietăţilor fiziopatologice ale anticorpilor, s-au făcut numeroase progrese în ultimele două decenii; acestea sînt prezentate pe larg în tratatele şi publicaţiile de specialitate (13—26).

4.2.4. TEHNICI DE OBŢINERE A ANTICORPILOR PENTRU RIA

I. *Răspunsul imunitar* umoral începe aproape imediat după contactul cu imunogenul. Totuşi incapacitatea metodelor de detectare a anticorpilor cu titru redus a dus la concluzia că după prima inoculare urmează o fază de latenţă şi apoi apar anticorpi circulanţi (fig. I.4.2).

Răspunsul imunitar după primul contact cu imunogenul se numeşte *răspuns primar*. Pentru majoritatea imunogenelor, răspunsul umoral primar constă din anticorpi din clasa IgM, care fiind catabolizaţi cu o rată de 3—4 ori mai mare decît anticorpii IgG, dispar relativ rapid din circulaţie. Contactele ulterioare cu imunogenul determină un răspuns imunitar exacerbat numit *răspuns secundar* sau *anamnestic*. Răspunsul secundar diferă de cel primar în multe privinţe: — doza de imunogen necesară pentru a produce niveluri

detectabile de anticorpi este mai mică; — faza de latență este scurtată; — rata sintezei anticorpilor este mai crescută; — concentrația anticorpilor în ser este mai mare; — clasa de anticorpi dominantă este IgG, iar valorile constantei de afinitate sînt mult mai mari decît la începutul răspunsului imunitar (1).

Capacitatea de a induce răspuns secundar persistă adesea indefinit (pe toată durata de viață a animalului), chiar după ce nivelul de anticorpi nu mai este detectabil.

II. *Prepararea imunogenului.* Pentru producerea anticorpilor, utilă în sistemele RIA, se folosesc polipeptide în stare nativă cu GM peste 1 000.

Pentru ca substanțe neproteice sau peptide mici (sub 1 000 GM) să devină imunogene sînt necesare procedee mai complexe prin care se prepară conjugate haptenă-proteină (12, 27). Cele mai larg folosite sînt reacția cu anhidridă mixtă, reacția cu carbodiimidă, cu glutaraldehidă, reacția Mannich, oxidarea cu periodat etc. (tabelul I.4.7).

III. *Procedeele de imunizare* implică o serie de factori care pot influența rezultatul: sursa (străin sau nu) și calitatea imunogenului, forma de administrare (solubilă sau corpusculară), calea de administrare, doza, schema de imunizare, calitatea animalelor (cap. 4, tabelul I.4.1).

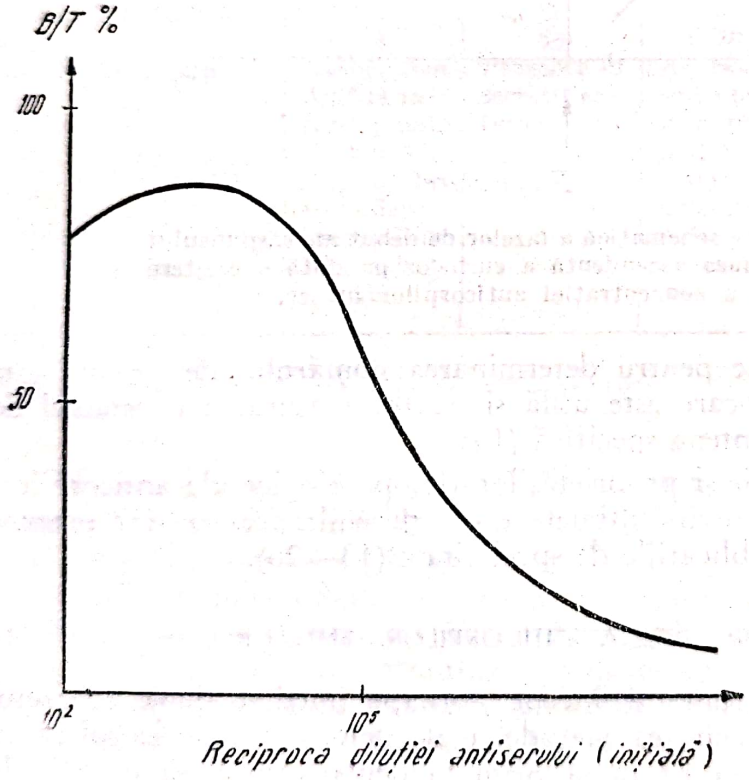


Fig. I.4.3. Titrarea antiserului în sistem RIA. B/T %= raportul ligandului marcat legat de anticorp față de ligandul marcat total introdus în reacție, în procente.

IV. *Caracterizarea antiserului.* Probele de ser obținute de la diferite animale, la sîngerările test și la sîngerarea la alb, sînt evaluate *individual*, pentru a selecționa pe acelea care sînt cele mai adecvate pentru RIA. Criteriile de apreciere sînt afinitatea, titrul și specificitatea.

Afinitatea se exprimă ca valoare a constantei de echilibru K în reacția antiserului cu antigenul marcat (ligandul marcat). Antiserurile cu afinitate mare au K de ordinul a 10^9 sau mai mult. Specificitatea și precizia unui sistem RIA depind de valoarea K. Metodele de determinare a constantei K sînt reprezentarea Scatchard cu sistem RIA și ecuația lui Sips cu date din dializa la echilibru.

Titrul este acea concentrație de antiser, care într-un sistem RIA, dă o legare de 30—60% a ligandului marcat (fig. I.4.3). Cînd se specifică titrul antiserului folosit într-un anumit sistem RIA, este necesar să se specifice și volumul de reacție pentru a se putea aprecia dacă titrul este cel inițial sau cel final (după rediluare în amestecul de incubare). În practică, se fac diluții

Tabelul I.4.7.

Metode de preparare a conjugatelor haptenă-proteină prin legături covalente şi a complexelor haptenă-proteină prin legături electrostatice (12)

Categoria	Gruparea funcţională a haptenei	Metoda de conjugare prin legătură covalentă	Exemple
I COOH	Carboxil	a) *Anhidridă mixtă* Conjugatul conţine 25—35 grupări haptenice per molecula de proteină. Metodă directă: nu necesită prepararea şi izolarea unui derivat activ b) *Carbodiimide* Proteină + haptenă în exces, în soluţie apoasă; contact: 30 minute — cîteva zile; purificare: dializă-conservare: liofilizare; metodă directă c) *Alte metode*: Conversiunea haptenei la azidă, de ex. acetil-salicilic-azidă; azida se cuplează cu globulina serică de iepure în soluţie: 1 : 1 dioxan-apă alcalinizată. Se conjugă 25—30 de grupări haptenice pe molecula de proteină	Peptide: angiotensina, bradikinina, unii steroizi, prostaglandine, medicamente: aspirină, cortizon-21-hemisuccinat, T-17-hemisuccinat angiotensină bradikinină gastrină, cAMP morfină, LSD, prostaglandine, acid folic etc.
II NH_2	Amine aromatice Amine alifatice	Conversiunea haptenei la derivaţi de diazoniu care, la pH∼9 reacţionează mai ales cu reziduuri de histidină, tirozină sau triptofan ale proteinei a) *Carbodiimide* b) Conversiunea la p-nitrobenzoil-amidă prin reacţia cu clorură de nitrobenzoil. Derivatul amidă este redus prin hidrogenare catalitică sau prin alt procedeu la derivat p-aminobenzoil; acesta, prin diazotizare poate fi cuplat cu o proteină c) *Glutaraldehidă*: gruparea amino- a haptenei este cuplată cu grupările amino- ale proteinei	Cloramfenicol ACTH, glucagon, normetanefrină, vasopresină, ocitocină
III OH	Hidroxil: alcooli fenoli	a) *Derivaţi hemisuccinaţi*: Conversiunea alcoolului la hemiesterul acidului succinic (hemisuccinat). Hemisuccinatul are o grupare COOH disponibilă, care poate reacţiona ca la I a, b, c. Conversiunea la hemisuccinat necesită o reacţie cu anhidridă succinică în prezenţa piridinei b) *Derivaţi de clorocarbonat*: Clorocarbonatul reacţionează direct cu grupările amino- ale proteinei în prezenţa bicarbonatului c) *Derivaţi aminofenilici*: Fenolii sînt convertiţi la reactivi activi prin reacţia cu acid p-aminobenzoic diazotizat. Astfel, în moleculă este introdusă o grupare carboxil. Variantă: conversiune la aminobenzoil eter urmată de diazotizare	Steroizi, cAMP, alte nucleotide, zaharuri Testosterona-17-clorocarbonat

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul I.4.7. (continuare)

Categoria	Gruparea funcţională a haptenei	Metoda de conjugare prin legătură covalentă	Exemple
		d) *Oxidare la dialdehide*: Reacţia grupelor hidroxil învecinate cu periodat pentru a da dialdehide. Dialdehida reacţionează cu grupările aminoale proteinei pentru a da aldimide, care sînt stabilizate prin reducere cu borohidrat de sodiu. Rezultă conjugate cu 30 de grupări determinante per molecula de albumină	Orice compuşi cu grupări OH vecine: glicoli, derivaţi de glicerol, glicozide ca digoxina
		e) *Oxidare la carboxil*	uridina, pseudouridina alte nucleotide
		f) *Alte metode hidroxil*: Reacţia derivatului izopropilidină cu clorură de p-nitrobezoil pentru a da 5-ester	uridina
IV Alte grupări funcţionale	Cetone	Convertire la O-(carboxil-metil) oxime	Testosteronul Estrona
	Aldehide	Conjugare directă cu proteina prin formarea unei baze Schiff, urmată de stabilizarea legăturii prin reducere cu borohidrat de sodiu	
	Sulfhidril	Formează punţi disulfidice cu alte grupări sulfhidril. Majoritatea proteinelor nu au multe grupări sulfhidril, de aceea sînt îmbogăţite artificial prin reacţii cu N-acetil-homocisteină tiolactonă. Reacţia de cuplare se face în tampon acetat la pH=4, cu H_2O_2 şi exces de haptenă, de exemplu acid penicilenic	Penicilina
	Grupări aromatice	Reacţia cu compuşi de diazonium	TRH (reacţia are loc la histidină)
	Hidrogeni reactivi	Reacţia Mannich: se foloseşte formaldehida ca punte între grupările aminoale proteinei şi compuşi care conţin unul sau mai mulţi hidrogeni reactivi	Serotonina
	Haptene reactive	Cuplare directă cu proteina: penicilina reacţionează cu proteina la pH uşor alcalin	Denitrofluorbenzen, Penicilina

Conjugate electrostatice (*necovalente*)
Complexare a haptenelor bazice sau acide cu proteina modificată prin fosforilare, metilare etc.

seriate din antiser şi după incubarea cu ligandul marcat şi separarea ligandului marcat liber de cel legat de anticorp se calculează procentul legării. Se observă uneori că, paradoxal, antiserul în concentraţie mare (de exemplu 10^{-2}) dă o legare mai redusă decît la concentraţii mai mici (de exemplu 10^{-3}).

V. *Specificitatea* unui antiser se defineşte prin capacitatea de a recunoaşte imunogenul corespunzător. Evaluarea specificităţii se face prin testarea reacţiilor încrucişate cu substanţe bănuite că ar putea interfera în sistemul RIA. Gradul de reacţie încrucişată cu o substanţă se testează cu ajutorul

Scanned with OKEN Scanner

curbelor obținute cu concentrații progresive din substanța imunogenă și din cele suspecte. Dacă curba substanței imunogene este identică cu cea suspectă, reacția încrucișată este completă și deci antiserul nu poate face nici o distincție între cele două substanțe. Frecvența reacțiilor încrucișate parțiale dă curbe mai mult sau mai puțin turtite ale antiserului cu substanțele suspecte.

4.2.5. STANDARDIZAREA ANTISERULUI

Caracteristicile antiserului (titrul, afinitatea și specificitatea) apar diferite, calitativ și cantitativ, dacă condițiile de testare sînt diferite ținînd seama că pot interveni o serie de factori ca metoda de testare, calitatea trasorului, tehnica de separare etc. De aceea, s-a conchis că antiserului i se poate aplica legea „tot sau nimic", ceea ce ar însemna că un antiser este bun sau nu pentru scopul pentru care a fost preparat (28). În aceste condiții, antiserurile de referință sau etalon nu par utile. Totuși, uniformizarea reactivilor, în special pentru laboratoarele de rutină, rămîne un deziderat încă, ținînd seama că nu toți cei care aplică metodele RIA au și posibilitatea de a-și produce singuri antiseruri. În acest scop, apare utilă vehicularea unor antiseruri etalon naționale sau regionale după exemplul Consiliului britanic de cercetări medicale (British Medical Research Council) sau al Agenției naționale pentru hipofiză din Statele Unite (U. S. National Pituitary Agency).

4.2.6. PURIFICAREA ANTISERURILOR

În sistemele RIA (ca și în sistemele imunochimice), antiserurile *specifice* pot fi folosite ca atare, ca în marea majoritate a metodelor uzuale, sau ca fracțiune gamaglobulinică izolată prin metode chimice (precipitare cu alcool, sulfat de sodiu sau de amoniu, rivanol) sau fizicochimice (cromatografie pe coloană preparativă). Antiserurile *nespecifice* (cu specificități multiple) sînt supuse în prealabil absorbției cu antigenul cu care dau reacții încrucișate, ca în cazul serului anti-FSH care este supus absorbției cu HCG[1] pentru a îndepărta anticorpii anti-LH. În altă variantă, antigenul cu care un anumit antiser dă reacții încrucișate este adăugat direct în sistemul de dozare, ca în cazul RIA TSH[2] cînd HCG este adăugat în sistem pentru a elimina interferența cu LH în dozare.

Atît tehnicile de precipitare cu substanțe chimice cît și procedeele de absorbție (neutralizare) prezintă inconvenientul că duc la scăderea titrului anticorpilor.

În unele sisteme RIA, cum sînt cele imunoradiometrice, este necesar să se utilizeze antiseruri foarte purificate. În acest scop s-a recurs la absorbția antiserurilor pe antigene insolubilizate. Tehnica prevede trei faze principale: 1) insolubilizarea antigenului; 2) absorbția anticorpului specific pe antigenul insolubilizat; 3) eluarea anticorpilor de pe antigenul insolubilizat (imunosorbent) (29).

---

[1] HCG prezintă comunitate antigenică (subunitatea α) cu LH și este mai ușor de obținut decît LH.

[2] TSH prezintă comunitate antigenică (subunitatea α), cu LH, iar preparatele de TSH uman folosite pentru imunizare sînt contaminate cu LH.

Scanned with OKEN Scanner

4.2.7. FORMA DE UTILIZARE A ANTISERULUI

În sistemele RIA, antiserul este folosit sub două forme principale: în forma solubilă și insolubilizat. Antiserul în forma *solubilă* este utilizat ca atare; nu se recomandă folosirea amestecului de antiseruri (27). Sînt folosite de asemenea fracțiunile gamaglobulinice izolate prin metode chimice, fizico-chimice sau imuno-chimice (imunosorbenți). În cazul imunosorbenților, dacă antigenul folosit pentru prepararea imunosorbentului este pur, anticorpii izolați vor fi cei cu afinitate maximă.

În forma *insolubilă*, anticorpul este utilizat în diferite variante: *preprecipitare* cu un al doilea anticorp, *absorbit* pe discuri sau eprubete din polimeri macromoleculari (polistiren, polipropilen etc.), *legat covalent* pe particule de Sepharoză, rondele de celuloză etc.

Forma insolubilă a anticorpului are un dublu avantaj: anticorpii sînt mai puri, de exemplu polimerii macromoleculari reține anticorpii cu afinitatea cea mai ridicată, iar separarea complexelor antigen-anticorp de antigenul liber, numită separare în fază solidă, este mai simplă.

4.2.8. CONSERVAREA ANTISERURILOR

Tehnicile de conservare necesită adaptări în funcție de forma solubilă sau insolubilă a antiserului. Antiserul sub formă *solubilă* poate fi conservat la temperaturi joase, prin *congelare*, care este modalitatea cea mai uzitată (30, 31). Practic, antiserurile sînt păstrate ca atare, dar preferabil diluate în tampon, cu sau fără conservant, în flacoane astupate. Nu se folosesc bacteriostatice de tipul crezolilor. Congelarea și decongelarea se fac rapid. Se recomandă evitarea congelării și decongelării repetate. Cînd sînt păstrate la +4°C, se adaugă bacteriostatice. Conservarea prin *liofilizare* implică aceleași reguli ca liofilizarea oricăror soluții proteice concentrate.

Anticorpul în forma *insolubilizată* poate fi liofilizat și păstrat apoi la +4°C, ca de exemplu anticorpul preprecipitat; polimerii încărcați cu anticorp sînt conservați la +4°C.

4.3. REACȚIA DE TIP ANTIGEN-ANTICORP

Antiserul este un lichid biologic foarte complex, care conține un spectru de anticorpi cu energii de legare (afinități) variind în limite largi (fig. I.4.4). În RIA, anticorpul are rol de reactiv de legare, corespunzător proteinei plasmatice în sistemele CBPA și al proteinei din receptorul celular în sistemele RRA. Spre deosebire de aceste proteine naturale anticorpul poate recunoaște specific și în exclusivitate o anumită substanță pe cînd de exemplu TBG recunoaște și T_3 și T_4, iar receptorul membranei plasmatice hepatice recunoaște o multitudine de substanțe polipeptidice hormonale. Natura reacției dintre aceste proteine și ligand este puțin cunoscută; se consideră că recunoașterea specifică a anticorpului ar putea fi un caz particular al reacției de asociație a tranzinelor (1) și al receptorilor celulari.

Scanned with OKEN Scanner

Elementele principale ale reacţiei antigen-anticorp sînt determinantele antigenice, locul (*situs*-ul) de combinare (al anticorpului) cu antigenul şi forţele care permit şi menţin legătura dintre antigen şi anticorp.

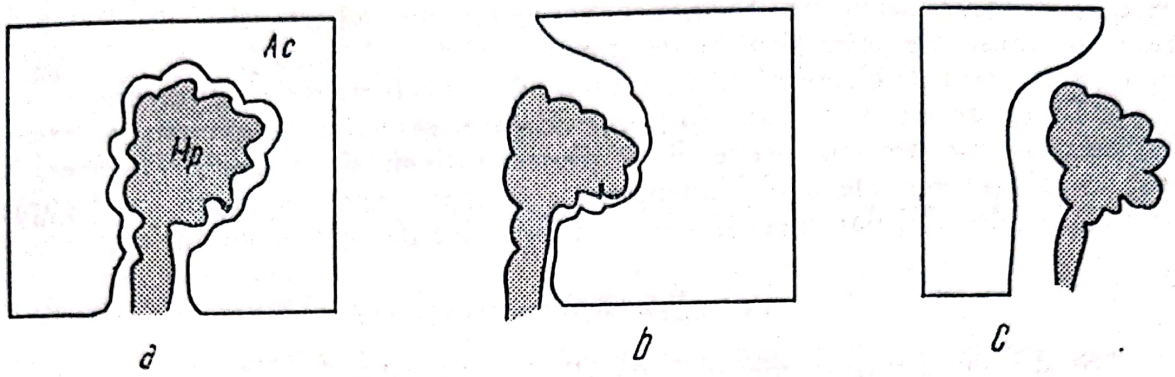


Fig. I.4.4. Reprezentarea schematică şi intuitivă a afinităţii populaţiilor de anticorpi (Ac dintr-un antiser pentru o anumită haptenă (Hp):
a) — afinitate mare; *b* — afinitate moderată; *c* — afinitate slabă.

4.3.1. DETERMINANTUL ANTIGENIC

Este o porţiune limitată a moleculei de antigen (aproximativ 5—6 aminoacizi dintr-o macromoleculă), iar în cazul haptenei poate fi implicată toată molecula. Un anticorp specific poate recunoaşte modificări minore ale structurii determinantului antigenic. Exemple numeroase oferă serurile antisteroizi: serul anti-estradiol 17 β (estra — 1, 3, 5 — trien — 3,17 β — diol) nu recunoaşte estriolul (estra — 1, 3, 5 — trien — 3,16 α, 17 β — triol).

4.3.2. *SITUS*-UL (LOCUL) DE COMBINARE CU ANTIGENUL

Reprezintă acea parte a moleculei anticorp unde are loc legătura dintre antigen (gruparea determinantă) şi anticorp. El a fost localizat intercatenar, în fragmentul F_{ab} al IgG şi la alcătuirea lui participă 10—20 aminoacizi (32). Pe fiecare moleculă de anticorp există două *situs*-uri de combinare specifică cu antigenul (cu un acelaşi determinant antigenic), deci anticorpul este bivalent.

4.3.3. FORŢELE DE LEGĂTURĂ

Sînt necovalente[a]), mai slabe.

I. *Legătura de hidrogen:* atomi puternic electronegativi (de exemplu oxigen, azot), în soluţii apoase, atrag nuclei (protoni) de hidrogen. Legătura de hidrogen implică grupările C—O şi N—H ale proteinelor. Este o legătură slabă, pentru a cărei desfacere este suficientă o energie de 4,5 Kcal/mol.

II. *Legăturile hidrofobe* sînt interacţiuni între grupări nepolare în mediu apos. Aproximativ 35—50% dintre proteine conţin lanţuri laterale nepolare (alanină, valină, leucină, izoleucină, prolină şi fenilalanină) sau care se comportă ca grupările nepolare (metionina, cistina, cisteina, triptofanul). Grupările nepolare tind să agrege cînd se apropie în soluţii apoase, deoarece ele resping moleculele de apă învecinate.

---

a) = legătură covalentă = legătură chimică prin schimb de electroni. Pentru a desface o legătură covalentă sînt necesare 110 Kcal/mol.

III. *Forţele coulombiene* se formează prin interacţiuni ionice între grupări cu încărcare opusă. Intensitatea acestor forţe depinde de pH-ul mediului apos.

IV. *Forţele van der Waals* sînt foarte slabe şi apar între moleculele care se apropie între ele. Se pare că rezultă din forţele de atracţie dintre capetele opuse ale unei perechi de dipoli. Cînd moleculele se apropie aşa de mult încît norul de electroni se suprapune, domină forţele de respingere.

Toate aceste forţe au fost considerate insuficiente pentru a explica legătura practic aproape ireversibilă dintre antigen şi anticorp. De aceea au fost imaginate modele multidimensionale în care este implicată configuraţia spaţială a celor doi parteneri şi aspecte topologice de complementaritate.

4.3.4. LEGEA ACŢIUNII MASELOR

Studii cu ajutorul metodei de dializă la echilibru şi apoi cu sisteme RIA au permis aprecieri asupra cineticii şi termodinamicii reacţiei antigen-anticorp şi calculul constantei de echilibru. Rezultatele obţinute stau la baza teoriei matematice a sistemelor RIA şi CBPA (33—43).

La rîndul lor, modelele matematice au permis definirea parametrilor sistemelor de dozare şi au dus în cele din urmă la crearea unor sisteme automate de analiză, prelucrare şi control al rezultatelor (43, 44, 45).

Cel mai simplu model matematic se bazează pe o serie de premize simplificatoare asupra sistemului de analiză RIA şi similare:

— reacţia antigen-anticorp decurge după legea acţiunii maselor;

— *situs*-urile de legare ale anticorpului sînt omogene şi interacţionează independent (fără fenomene de cooperare);

— reacţia ajunge la echilibru;

— separarea complexului legat de ligandul liber este completă şi nu perturbă echilibrul reacţiei.

Reacţia antigen-anticorp poate fi descrisă în ecuaţia:

$$Ag + Ac \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} AgAc, \qquad (1)$$

unde: k_1 = constanta de asociere

k_2 = constanta de disociere.

La echilibru, conform legii acţiunii maselor (de ordinul întîi — cinetica chimică de ordinul doi),

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[AgAc]}{[Ag][Ac]}, \qquad (2)$$

unde K = constanta de echilibru a reacţiei, iar parantezele arată concentraţiile molare ale reactivilor.

Înlocuind termenii din ecuaţia (2) cu datele obţinute printr-una din metodele experimentale (dializă la echilibru, reprezentare Scatchard), se poate calcula constanta de echilibru K. Constanta K defineşte afinitatea unui antiser pentru un antigen dat şi este exprimată în litri/mol.

Cunoscînd valoarea constantei K, se poate prevedea cantitatea de anticorp care este necesară într-un anumit sistem RIA şi se poate calcula şi cantitatea de ligand marcat corespunzător. De exemplu, pentru majoritatea sistemelor se recomandă sisteme cu 3/K anticorp şi 4/K ligand marcat (33).

Scanned with OKEN Scanner

1. **Ransom J. P.** — Practical competitive binding assay methods, Mosby Company, Thl. C. V., Saint Louis, 1976.
2. **Aubert M. L.** —Critical study of the radioimmunological assay for the dosage of the polypeptide hormones in plasma, Ed. Minerva Medica, Torino, 1971.
3. **Chard T., Forsling M. L., Janas M. A. R., Kitaw M. J., Landon J.** — J. Endocrinol., 1970, *46*, 533.
4. **Chard T., Kitaw M. J., Landon J.** — J. Endocrinol., 1970, *46*, 269.
5. **Playfair J. J. L., Hurn B. A. L., Schulster D.** — Brit. med. Bull., 1974, *30*, 24.
6. **Vaitukaitis J., Robbins J. I. B., Nilschlag E., Ross G. T.** — J. clin. Endocrin., 1971, *33*, 988.
7. **Janson V. H. T., Jeffcoate S. L.** — Brit. Med. Bull., 1974, *30*, 50.
8. **Erlanger B. F., Borek F., Beiser B. M., Liberman B.** — J. Biol. Chem., 1957, *228*, 713.
9. **Péron F. G., Caldwell B. V.** (editori) — Immunologic methods in steroid determination, Appleton-Century-Crofts Inc., Meredith Corp., New York, 1970.
10. **Cameron E. H. D., Hillier S. G. H., Griffiths K.** (editori) — Steroid Immunoassay, Alpha Omega Publ. Ltd., Cardiff, Wales, 1975.
11. **Abraham G. E.** (editor) — Handbook of Radioimmunoassay, Marcel Dekker, New York, Basel, 1977.
12. **Beiser S. M., Butler V. P. Jr., Erlanger B. F.** — In: „Textbook of Immunopathology" (editate de P. A. Miescher și H. J. Müller-Eberhard), Grune and Stratton Inc., New York, 1976, p. 15.
13. **Porter R. R.** — In: „Basic Problems in Neoplastic Disease", Columbia University, Press, New York, 1962, p. 177.
14. **Kabat E. A., Mayer M. M.** — Experimental Immunochemistry, Ch. C. Thomas Publisher, Springfield, Ill., 1971.
15. **Valantine R. C., Green N. M.** — J. molec. Biol., 1967, 22, 615.
16. **Singer S.** — Adv. Protein. Chem., 1967, *22*, 1.
17. **Kabat E. A.** — Structural concepts in immunology and immunochemistry, Holt, Rinehart and Wiston, New York, 1968, p. 112.
18. **Putnam F. W.** — Science, 1969, *163*, 633.
19. **Ghetie V.** — In: „Progrese recente în disciplinele imunologice" (editat de N. Nestorescu), Ed. medicală, București, 1969, p. 67.
20. **Edelman G. M.** — In: „Developmental aspects of antibody formation and structure" (editat de J. Sterzl și I. Riha), Academia, Praga, 1970, p. 381.
21. **Curmingham B. A., Gottlieb P. D., Pelumm M. N., Edelman G. M.** — In: „Progress in Immunology", Academic Press Inc., New York, 1971, p. 3.
22. **Friedenson B., Appella E., Roholt O. A., Pressman D.** — Biochem. biophys. Res. Commun., 1972, *48*, 1 208.
23. **Edelman G. M.** — In: „Cellular selection and regulation in the immune response" (editat de G. M. Edelman), Raven Press. New York, 1974, p. 1.
24. **Rowe D. S.** — In: „Clinical Aspects of Immunology" (editat de P.G.H. Gell, R.R.A. Crombs, P. J. Lachmann), ed. a III-a, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975, p. 285.
25. **Gheție V.** — In: „Imunobiologie, imunochimie, imunopatologie" (editat de I. Mesrobeanu și Șt. Berceanu), Ed. Acad. R.S.R., 1975, p. 91.
26. **Roitt I. M.** — Essential Immunology, ed. a II-a, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1977.
27. **Erlanger B. F.** — Pharmacol. Rev., 1973, *25*, 271.
28. **Hurn B. A. L.** — IAEA Panel, 1972.
29. **Rose N. R., Bigazzi P. E.** — Methods in Immunodiagnosis, Wiley and Sons, Inc, John, New York, City, 1973.
30. **Rey L. R.** — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1969, *85*, 510.
31. **Greaves R. J. N.** — Cryobiology, 1968, *5*, 76.
32. **Friedenson B., Appella E., Roholt O. A., Pressman D.** — Biochem biophys. Res. Commun., 1972, *48*, 1 206.
33. **Ekins R. P., Newman G. B., O'Riordan J. L. H.** — In: „Radioisotopes in Medicine: in vitro Studies" (editat de R. L. Hayes, F. A. Goswitz și B. E. P. Murphy), U.S. Atomic Energy Commission, Oak Ridge, Tennessee, 1968, p. 59.

Scanned with OKEN Scanner

34. **Rodbard D., Rayford P. L., Cooper J. A., Ross G. T.** — J. clin. Endocr., 1968, *28*, 1 412.
35. **Yalow R. S., Berson S. A.** — In: „Protein and Polypeptide Hormones" (editat de M. Margoulies), Excerpta Medica, Int. Congr. Ser., 151, Amsterdam, 1969, p. 71.
36. **Ekins R. P., Newman G. B.** — In: „Protein and Polypeptide Hormones" (editat de M. Margoulies), Excerpta Med. Int. Congr. Ser. 161, Amsterdam, 1969, p. 329 și 575.
37. **Rodbard D., Bridson W., Rayford P. L.** — J. Lab. clin. Med., 1969, *74*, 770.
38. **Ekins P., Newman G. B.** — Acta Endocrinol. Suppl., 147, 1970, *64*, 11.
39. **Rodbard D., Lewald J. E.** — Acta Endocrinol. Suppl., 147, 1970, *64*, 79.
40. **Yalow R. S., Berson S. A.** — In: „Competitive Protein Binding Assays" (editat de W. D. Odell și W. H. Daughaday), Lippincott, Co., J. B., Philadelphia, 1971, cap. 1.
41. **Feldman H., Rodbard D., Levine D.** — Anal. Biochem., 1972, *45*, 530.
42. **Ekins R. P., Newman G. B., Piyasena R., Banks P., Slater J. D. H.** — J. Steroid. Biochem., 1972, *3*, 289.
43. **Walker W. H. C., Keans P. M.** — In: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York — Basel, 1977, p. 87.
44. **Ekins R. P.** — Development of immunoassay, In: „International Symposium on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", 31. X—4. XI. 1977, Berlin (vest).
45. **Rodbard D., Munson P., De Leon A.** — Improved Curve Fitting, Characterization of Sensitivity and Specificity, validation and optimization for radioligand assays, In: „International Symposium on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", 31. X. — 4. XI. 1977, Berlin (vest).
46. **Mayer R. J., Walker J. H.** — Immunochemical methods in the Biological Sciences: Enzymes and Proteins, Academic Press, London, 1980, p. 13.

Scanned with OKEN Scanner

5

ANSAMBLUL SISTEMELOR DE RADIOIMUNOANALIZĂ

În capitolele precedente au fost prezentate principalele componente ale sistemelor RIA: antigenul (ligandul) marcat şi anticorpul. Sistemele RIA mai implică şi folosirea unui preparat de referinţă sau standard, util pentru reprezentarea unei curbe etalon (standard). Particularităţi ale pregătirii probelor biologice sînt tratate în partea specială, dar unele reguli generale sînt de menţionat. O atenţie specială trebuie acordată mediului şi condiţiilor de incubare. În orice sistem RIA se aplică o tehnică de separare. Calculul rezultatelor şi analiza performanţelor unui sistem de dozare, precum şi controlul calităţii alcătuiesc o altă latură a metodologiei acestui domeniu.

Componentele sînt astfel asamblate într-un sistem de analiză cantitativă complex: sistemul RIA.

5.1. PREPARATUL DE REFERINŢĂ SAU STANDARDUL

În RIA, cantificarea rezultatelor se bazează pe compararea reducerii legării antigenului marcat de către anticorpul corespunzător determinată de probele necunoscute cu cea determinată de un preparat standard.

Cantificarea comparativă a substanţelor bioactive a fost fundamentată odată cu standardizarea biologică a insulinei, în urmă cu peste jumătate de secol. Principiile de bază ale standardizării biologice (1, 2) au fost completate cu reguli noi, aplicabile sistemelor RIA (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

5.1.1. DEFINIŢIE ŞI PRINCIPIU

Practic, un standard sau un preparat de referinţă este o probă dintr-un material considerat adecvat pe baza cunoştinţelor asupra preparatelor existente în momentul elaborării sale, asemănător (dacă nu identic) cu substanţa de dozat şi suficient de stabil şi de maniabil în condiţii de lucru uzuale.

Termenul de „standard" poate fi aplicat numai substanţelor de referinţă ideale, adică unei probe din substanţa „pură" pe care dorim să o măsu-

Scanned with OKEN Scanner

răm şi care este disponibilă, bine caracterizată, necontaminată cu compuşi care pot interfera şi stabilă în cursul diferitelor manipulări.

Pentru sistemele RIA ale polipeptidelor nu dispunem de standarde ideale (ca în cazul steroizilor). Standardele folosite pentru cantificarea polipeptidelor, prezentînd abateri de la condiţia ideală, au fost numite „preparate de referinţă" deşi adesea aceşti doi termeni sînt folosiţi unul în locul celuilalt.

Principiul de bază al oricărui sistem de cantificare comparativă este acela că „ceva similar se compară cu ceva similar" (3, 7). În esenţă, aceasta înseamnă că pornim de la presupunerea că substanţa pe care o dozăm este identică în cele două produse pe care le comparăm şi anume, în proba necunoscută şi în preparatul standard sau, mai poate însemna că, chiar dacă există diferenţe între ele, sistemul de dozare nu le sesizează. Rezultă că în sistemele RIA, standardul trebuie să fie imunochimic identic cu substanţa pe care o măsurăm.

5.1.2. SIMILITUDINEA STANDARD – PROBĂ BIOLOGICĂ

Şi în sistemele de bioanaliză şi în cele RIA, măsura în care neidentitatea standard — probă biologică perturbă cantificarea este dependentă de specificitatea întregului sistem de dozare.

Structura moleculară a hormonilor poate să varieze în funcţie de mulţi factori, de exemplu sursa (glandă, plasmă, urină, LCR, salivă), tehnica chimică de extracţie, existenţa formelor izomere, a precursorilor sau a metaboliţilor. De aceea, *specificitatea* sistemelor RIA poate fi perturbată de prezenţa în sistem a unor mixturi, în proporţii variabile, de antigene imunochimic înrudite, situaţii întîlnite frecvent şi care creează probleme în cantificarea comparativă (tabelul I.5.1).

Tabelul I.5.1

Situaţii în care apar diferenţe între substanţa de dozat şi preparatul de referinţă determinînd rezultate disparate ale dozării (7)

Exemple de forme care pot reacţiona în sistemul de dozare	Exemple de diferenţe (abateri structurale) care pot apare
Specii animale diferite	Insulina porcină, bovină — insulină umană
Tulpini diferite	Virusuri: antigenul B al hepatitei
Ţesuturi normale diferite	Glucagon pancreatic — enteroglucagon TSH hipofizar — TSH placentar
Acelaşi ţesut normal	Glucagon pancreatic cu greutăţi moleculare diferite
Ţesut glandular hipertrofiat	HGH secretat în acromegalie
Tumori cu secreţie hormonală ectopică	„Big ACTH"
Tumori ale sursei normale de sinteză hormonală	HCG în mola hidatiformă
Lichide biologice (plasmă, urină, LCR) şi extracte glandulare	Diferite forme ale LH, FSH, TSH, Pth
Ţesut normal în cursul sarcinii (hipofiza şi placenta)	HGH şi HPL
Forme alelice care apar în mod normal	Insulinele de şobolan
Forme alelice determinate genetic	Izoenzime
Precursori	Proinsulina Angiotensinogenul
Conjugaţi metabolici	Steroizi în urină şi în plasmă
Fragmente rezultate din metabolism	Fragmente de ACTH, angiotensină, HCG, produşi de degradare ai fibrinei

Din acest punct de vedere, în cursul evoluției sistemelor RIA, au elaborate două generații de sisteme:

A. Generația I cuprinde sisteme RIA care nu sesizează diferențe între molecule fiziologic active, precursori, fragmente sau forme patologice. Majoritatea sistemelor RIA, pentru dozarea insulinei, LH, FSH, disponibile comercial sînt de acest tip.

B. Generația II cuprinde sisteme diferențiate pentru hormonii fiziologic activi, pentru precursorii lor (insulina — proinsulina) sau pentru subunități specifice (beta-HCG, beta-LH, beta-FSH, beta-TSH).

5.1.3. SELECȚIA ȘI ELABORAREA STANDARDELOR

Preparatele de referință și standardele folosite în RIA sînt preparate comune sau primare (internaționale, naționale sau regionale) și locale (preparate de laborator calibrate față de primele).

Standardele pentru substanțe chimic definite pot fi obținute comercial, ca de exemplu cele pentru steroizi.

Preparatele de referință uzuale pentru sisteme RIA ale polipeptidelor sînt extracte glandulare, de plasmă sau de urină. Cu metodele actuale, o caracterizare exhaustivă a acestor preparate nu este posibilă, metodele biologice convenționale nu sînt capabile să detecteze formele aberante.

La elaborarea unui preparat de referință sînt respectate cîteva condiții esențiale:

a) identitatea sau cel puțin similitudinea cu substanța pe care o cantificăm, testată de exemplu prin paralelismul curbelor doză-răspuns;

b) absența contaminanților care pot interfera în sistem;

c) să fie solubil în diluentul folosit în sistemul de dozare;

d) să fie chimic stabil;

e) să poată fi distribuit în porții mici omogene;

f) să fie stabil în timpul transportului, al conservării în condiții de laborator și al lucrului.

Un preparat poate fi acceptat ca standard dacă a trecut prin următoarele faze: elaborarea și aplicarea în cîteva laboratoare specializate cu compararea rezultatelor; urmează folosirea curentă și din nou compararea rezultatelor.

Astfel de standarde sînt cele elaborate de Divizia de standarde biologice — National Institute for medical Research (Anglia) și NIH—NIAMDD—N.P.A. (Statele Unite).

5.1.4. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Exprimarea ideală a rezultatelor unei dozări (biologice sau imunochimice) este în echivalență de masă sau moleculară, ceea ce nu este posibil decît pentru substanțe fizico-chimice bine caracterizate.

Practic, exprimarea activităților relative ale diferitelor substanțe dozate se face în termeni de *masă* sau în termeni de *unități*. O.M.S., prin comisia de experți în standarde biologice recomandă că, ori de cîte ori s-a stabilit unitatea biologică pentru un preparat de referință, activitățile relative ale diferitelor substanțe să fie exprimate în unități cu specificarea metodei folosite, imunodozare sau biodozare. Exprimarea în unități biologice are avantajul că

Scanned with OKEN Scanner

se poate transfera direct estimarea activității de la un preparat la altul, fără a recurge la factori de conversiune. Totuși, în acest sistem de notație nu pot fi comparate cantitățile relative ale diferitelor materiale în termeni de masă sau de concentrație moleculară (7).

A fost propus (10) un sistem de unități în care unitatea de reactivitate imunologică a antigenelor — notată cu *imm* — și unitatea de activitate biologică — notată cu *bion* — ar trebui să se refere, cel puțin pentru un standard primar, la aceeași cantitate. Din recomandările O.M.S. rezultă că unitățile internaționale pentru sisteme radioimunochimice (sau imunochimice) trebuie să fie stabilite pe baza activității biologice a unui standard existent. Rezultă că numărul de unități *imm* atribuit unui standard O.M.S. pentru imunodozare trebuie să fie echivalent cu numărul de unități *bioni* pe care acesta îl conține prin biodozare (7).

Indiferent de modalitatea de exprimare a rezultatelor comparativ cu un preparat de referință, problema principală este ca acesta să existe, să fie disponibil în cantități suficiente și să fie judicios utilizat.

5.1.5. PREPARATELE DE REFERINȚĂ ÎN LABORATOARELE DE RUTINĂ

Exceptînd preparatele de referință conținute în trusele RIA comerciale și care obișnuit sînt preparate locale calibrate față de cele internaționale, și cercetătorul, și practicianul folosesc preparate internaționale (primare) recunoscute de O.M.S. și preparate locale (naționale sau regionale) sau preparate de laborator calibrate față de cele primare.

În anul 1968 Comisia experților în standarde biologice a O.M.S. a stabilit că standardele biologice nu sînt adecvate pentru RIA hormonilor polipeptidici și a luat măsuri pentru aprovizionarea laboratoarelor cu preparate de referință adecvate.

Preparatele standard disponibile pot fi clasificate în trei categorii:

I. Antigene foarte purificate, bine caracterizate și pe cît posibil omogene, derivate de la aceeași specie cu substanța pe care o măsurăm. Acestea sînt standardele de elecție și această categorie include insulina umană și hormonul de creștere uman.

Uneori pot fi folosite și substanțe de la altă specie, cu condiția ca sistemul de dozare să nu poată face o distincție între ele. Nu este suficient de clar dacă preparatele de sinteză, care pot conține peptide greșite, sînt incluse în această categorie.

II. Antigene parțial purificate, incomplet caracterizate, pot fi folosite ca standarde temporare, pînă la obținerea unor preparate din prima categorie.

III. Plasmă totală, extracte brute de țesut glandular sau de urină, antigene bacteriene sau virale, pot fi de asemenea folosite pentru construirea curbei standard în RIA, în special în stadiile inițiale ale dezvoltării unei tehnici.

Preparatele, oferite gratuit de instituțiile desemnate de O.M.S., sînt prezentate sub formă liofilizată, în fiole însoțite de fișe informative și de instrucțiuni de folosire. Ținînd seama de dificultățile de elaborare și de cantitățile reduse față de necesități, măsurile pentru utilizarea economică a lor sînt binevenite. După deschiderea fiolei, conținutul este diluat la concentrații de

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1.5.2

Recoltarea, prelucrarea și conservarea materialelor biologice pentru determinări RIA

Materialul biologic	Mod de prelevrare	Prelucrare	Lichidul rezultat	Conservare
Sînge	venă periferică: puncție: cateterizare vena portă / vena suprarenală } chirurgical cordon ombilical — la naștere călcîi: puncție — la nou-născuți	— cu anticoagulant și/sau vase siliconate fără anticoagulant centrifugare	plasmă ser	Congelare sub —20°C cu decongelare rapidă în momentul folosirii
		— absorbții pe hîrtie de filtru, perforare discuri	ser uscat eluat	
		— microcapilare cu centrifugare	ser	
Urină	din 2 sau din 24 de ore	ajustare pH dializă centrifugare diluare în tampon	urină sau extract (conservabil și la +4°C)	
LCR	puncție lombară puncție suboccipitală puncție în fontanelă (nou-născut, embrion)	neprelucrat	LCR	
Salivă	stimularea secreției cu acid citric	centrifugare	salivă	
Lichid amniotic	amniocenteză în condiții bine controlate	neprelucrat sau extracție pentru hormoni steroizi	lichid amniotic sau extract	
Bilă	tubaj sau intraoperator	centrifugare dializă	bilă	
Spermă	postcoitum sau masturbare	centrifugare	lichid seminal	
Secreție lactată	mulgere manuală sau cu pompa	centrifugare degresare	— secreție galactoreică — lapte — colostru	
Țesut glandular, placentă, țesut tumoral	intraoperator, avort, naștere, necropsie	triturare, omogenizare în soluții selecționate în funcție de hormon, centrifugare	omogenat de țesut	

Scanned with OKEN Scanner

aproximativ 200 µg/ml, de preferat în soluţii neproteinate, pentru a evita contactul cu enzime active. Conservarea se face în porţii mici, prin congelare la temperaturi sub —20°C.

Preparatul de referinţă primar este folosit direct în fiecare serie de dozări, atunci cînd este disponibil în cantităţi suficiente. Mai economic este să fie folosit numai pentru calibrarea unui preparat de laborator, de exemplu extract de ţesut glandular sau plasmă. Stabilitatea în cursul conservării este verificată cu ajutorul probelor de control. Creşterea în timp a valorilor obţinute în probele de control faţă de valorile obţinute prin comparaţie cu standardul proaspăt, arată pierderea activităţii acestuia, în condiţii în care toţi parametrii dozării sînt identici.

Se recomandă ca datele asupra stabilităţii preparatelor de referinţă observate în laboratoare să fie comunicate la sursă.

5.2. PROBELE BIOLOGICE

Unul din avantajele RIA este că permite determinări în orice lichid sau ţesut biologic. În tabelul I.5.2. sînt trecute materialele biologice folosite pentru măsurarea substanţelor hormonale şi nehormonale, metodele de prelevare, prelucrare şi conservare.

5.2.1. SÎNGELE

În afara probelor recoltate pe cale chirurgicală, prelevarea probelor de sînge nu necesită instalaţii speciale. Unele dificultăţi apar totuşi la recoltarea probelor biologice în cursul investigaţiilor dinamice ca ritmicitatea circadiană sau probele dinamice (de exemplu hiperglicemia provocată, proba la insulină, proba la *releasing* factori etc.). În acest scop, se practică mai multe variante, nici una pe deplin satisfăcătoare:

a) puncţionarea repetată a venei este stresantă pentru pacient iar stresul poate influenţa valorile unor hormoni;

b) folosirea acului de venepuncţie siliconat lăsat în venă în tot timpul probei nu poate evita totdeauna coagularea sîngelui pe ac după 1—2 ore de la inserţie;

c) transfuzia lentă cu ser fiziologic imobilizează pacientul;

d) cateterizarea venei este un procedeu chirurgical rareori acceptat de pacient;

e) pomparea continuă necesită un aparat de pompare care este costisitor, iar valorile obţinute sînt valori integrate necomparabile cu valorile obţinute prin metodele uzuale; are avantajul că pacientul nu este stînjenit în activitatea sa şi poate fi investigat în cursul diferitelor tipuri de efort.

Marea majoritate a hormonilor şi a substanţelor nehormonale se dozează în ser. Hormoni ca ACTH, angiotensina, gastrina şi unii steroizi se dozează în plasma obişnuită din sînge heparinat cu aproximativ 10 UI/ml sînge. RIA în plasma heparinată dă concentraţii mai mari decît în ser (11), deoarece heparina este un polianionit puternic şi poate mima efectele unor electroliţi,

Scanned with OKEN Scanner

inhibînd reacţia antigen-anticorp la concentraţii de peste 20 U/ml (12). Aceste efecte dispar la scăderea concentraţiei sub 10 U/ml în mediul de incubare. Concentraţii convenabile ale heparinei pot fi obţinute tapetînd seringa sau cupa de recoltare cu heparină în concentraţie de 1 000 U/ml, aceasta înseamnă 0,1—0,2 ml de heparină deci 100—200 U pentru 10—20 ml sînge. Pentru a evita interferenţa substanţelor anticoagulante, dozarea se face în plasma diluată (1:10 — 1:25), ori de cîte ori sensibilitatea sistemului permite.

Caracterul anionic al heparinei mai poate interfera în procesul de adsorbţie al unor peptide foarte acide (de exemplu gastrina) pe schimbători de ioni bazici (12).

Tehnica de dozare este mult mai simplă şi mai rapidă dacă sistemul RIA permite folosirea lichidului biologic neprelucrat. Totuşi, concentraţiile reduse ale unor hormoni (octapeptide, ACTH) sau interferenţa cu substanţe similare (steroizi) fac necesară prelucrarea lichidelor biologice, procedură care complică şi prelungeşte durata determinării. În plus, procedeele de extracţie duc la pierderi variabile ale substanţei de dozat, ceea ce impune procedee suplimentare pentru estimarea recuperării.

La recoltarea probelor de sînge este necesar să se ţină seama de variaţiile circadiene ale substanţei pe care intenţionăm să o dozăm, de ritmul alimentaţiei, de conţinutul alimentelor, de medicaţia administrată, de starea de repaus sau de stres.

5.2.2. ALTE LICHIDE BIOLOGICE

(i) Folosirea *urinii* ca material destinat determinărilor hormonale necesită investigarea prealabilă a funcţiei renale, ţinînd seama că toţi hormonii cunoscuţi au greutăţi moleculare sub pragul de traversare a filtrului renal (13, 14).

(ii) Dozarea hormonilor în *lichidul cefalorahidian* (LCR) prezintă interes ţinînd seama că el vehiculează substanţe biologic active în zone cu formaţiuni nervoase importante. În cazuri patologice (tumori hipofizare) au fost puse în evidenţă valori crescute ale unor hormoni în LCR (15, 16, 17, 18).

(iii) Colectarea *lichidului parotidian* prin simpla stimulare cu citrice reprezintă un mijloc de screening nestresant. Procedeul a fost folosit pentru cantificarea unor medicamente ca antidepresivele ciclice şi anticonceptionalele de tip hormonal (19).

5.2.3. ŢESUTURI

Prelucrarea ţesutului glandular şi tumoral variază în funcţie de hormonul căutat. În general, ţesutul este recoltat intraoperator sau la necropsie, înghetat imediat prin congelare rapidă la —80°C şi conservat apoi sub —25°C. Nu au fost efectuate studii sistematice privitoare la viteza de degradare a hormonilor după deces (20). Pentru dozarea hormonilor peptidici, ţesutul prelevat este tăiat în stare congelată în felii subţiri şi apoi este omogenizat la 4°C, la o concentraţie de aproximativ 100 mg/ml solvent adecvat hormonului cercetat Omogenatul este centrifugat la turaţie mică la +4°C şi supranatantul este supus dozării ca atare sau fracţionat prin cromatografie.

Scanned with OKEN Scanner

5.2.4. PRELEVAREA PROBELOR PENTRU INVESTIGAȚII POPULAȚIONALE

Determinarea în masă a unor hormoni prezintă interes din punctul de vedere al prevenirii bolilor prin depistarea lor precoce. În această categorie intră dozarea T_3, T_4, TSH pentru depistarea hipotiroidiei și a altor disfuncții tioridiene la gravide și nou-născuți, dozarea HCG, HPL, estriolului la gravide pentru depistarea disfuncțiilor feto-placentare, dozarea testosteronei și a gonadotrofinelor hipofizare la muncitorii din industria insecticidelor organoclorurate, a secțiilor industriale cu noxe de tip tetraclorură de carbon etc. (tabelul I.5.3.).

Tabelul I.5.3

Determinări hormonale utile în medicina preventivă

Hormonul	Populația	Indicația	Metoda de prelevare	Rezultat
Ag HBs	donatori de sînge sănătoși contacți sau suspecți	permanent focare endemice	venepuncție	eliminarea donatorilor infectanți depistarea purtătorilor
T_3, T_4, TSH	nou-născuți, gravide	zone endemice	puncție călcîi venepuncție	depistarea disfuncției tiroidiene și tratament adecvat în timp util
HCG, HPL, Estriol	gravide	iminența avort semne de suferință fetală	venepuncție urină/24 de ore	tratament adecvat în timp util
Testosteronă, LH, FSH	muncitori industriali și agricoli	manipulare toxice: insecticide organo-fosforice (DDT), tetraclorură de carbon etc.	venepuncție	măsuri de igienă industrială

5.3. MEDIUL DE INCUBARE

Într-un sistem RIA, concentrația reactivilor principali (antiser, ligand marcat și nemarcat) este foarte redusă, condiție care generează efecte nedorite ca adsorbția antigenului pe eprubete, polimerizarea lui în timpul incubărilor, infectarea mediului prin prezența lichidelor biologice nesterile, proteoliză, modificări ale pH-ului lichidelor biologice etc. De aceea, compoziția adecvată a mediului de incubare își are importanța sa în metodele RIA, ca și în cele similare.

Mediul de incubare în RIA este alcătuit dintr-un sistem tampon și din factori de protecție.

5.3.1. SISTEMELE TAMPON

Sînt caracterizate prin natura ionilor și prin concentrația lor exprimată în termeni de forță ionică și pH. În majoritatea metodelor RIA sînt folosite

Scanned with OKEN Scanner

sisteme tampon uşor alcaline, cu pH 7,4—8,6. Forţa ionică a soluţiilor tampon este în general joasă, între 0,01 şi 0,04 M, deoarece concentraţiile crescute în săruri pot interfera reacţia antigen-anticorp. Sistemele tampon sînt folosite în RIA ca diluenţi ai următorilor reactivi: ligandul marcat, antiserul, standardul, proba biologică şi uneori agentul de separare (de exemplu al doilea anticorp, cărbunele-dextran). În unele sisteme RIA, tamponul este folosit şi pentru spălări la sfîrşitul incubărilor.

Sistemele tampon uzuale sînt prezentate în tabelul I.5.4.

Tabelul I.5.4

Sisteme tampon folosite în RIA (orientativ)

Sistemul tampon	Tehnica de separare	Sisteme RIA (exemple)
Fosfat 0,01 M, pH= 7,4—7,6 proteinat + mertiolat Na ±NaCl 0,15 M ±EDTA	dublu anticorp	HCG, TSH, prolactina, insulina, HCG, gastrina, TRH etc.
	PEG (polietilenglicol)	ACTH
	cărbune-dextran	estrogeni (estradiol, estronă, estriol), progesteron, testosteron
Veronal 0,05 M, pH=8,6, proteinat±mertiolat Na	cromatoelectroforeza	insulină
	cărbune-dextran	HPL, Parathormon, T_3, T_4
Tris 0,1—0,2 M, pH 7,3—7,5 proteinat±mertiolat Na	cărbune-dextran	LH-RH, calcitonină
Borat 0,075 M, pH 8,0 proteinat±mertiolat Na	dublu anticorp	secretină
	cărbune-dextran	mineralocorticoizi: aldosteron, deoxicorticosteron; glucocorticoizi: cortizol, corticosteron, compus B
Glicină 0,2 M, pH 8,8 proteinat	cărbune-dextran	glucagon

Unele sisteme RIA fac excepţie de la regula pH-ului uşor alcalin de exemplu formarea complexelor cAMP-anti-cAMP scade la pH alcalin, fiind maximă la pH între 4 şi 6 (*nu* sub 3), probabil ca urmare a instabilităţii cAMP în mediu neutru şi alcalin (21).

Sistemul tampon este selecţionat nu numai în funcţie de particularităţile reacţiei dintre antigen şi anticorp ci şi în funcţie de tehnica de separare (21). De exemplu, pentru separarea electroforetică se foloseşte tamponul veronal, pentru separarea cu dublu anticorp se foloseşte tamponul fosfat (cu excepţia sistemului RIA pentru gastrină), iar pentru separarea cu ajutorul adsorbanţilor se preferă tamponul borat.

La prepararea sistemelor tampon pentru RIA sînt necesare unele precauţii; printre acestea, esenţiale sînt puritatea sărurilor şi a apei (apă bidistilată sau deionizată).

Exceptînd tamponul borat, care este antiseptic prin compoziţia sa, în toate celelalte sisteme tampon se foloseşte un conservant ca azida sau mertiolatul de sodiu, în concentraţie de 0,1—0,2 g/l.

În rezumat, rolul sistemului tampon este de diluent, de mediu favorizant al reacţiei antigen-anticorp, de mediu favorizant al unei bune sepa-

Scanned with OKEN Scanner

rari și de a menține constant pH-ul amestecului de reacție în cursul incubărilor, deoarece probele biologice au cel mai frecvent pH variabil de la o probă la alta.

5.3.2. SISTEME TAMPON PROTEINATE

Concentrația redusă a reactivilor folosiți în RIA este corectată prin îmbogățirea mediului de incubare în proteine ca albumina serică (bovină sau umană), gelatina sau lizozimul.

Rolul acestor proteine este multiplu:

— împiedică absorbția ligandului marcat (și nemarcat) pe pereții eprubetelor de incubare, menținînd astfel reactivii în mediul de reacție;

— previn efectele radiolizei (rol de „gunoieri") și se comportă ca purtători ai ligandului aducîndu-i determinantele antigenice în preajma *situs*-urilor de combinare ale anticorpului;

— previn polimerizarea antigenului, probabil prin unele legături laxe la nivelul grupărilor lor reactive.

Pentru dozarea acelor hormoni care pot fi legați competitiv de globuline serice, cum sînt T_3, T_4 sau unii steroizi, puritatea albuminei este esențială. Totuși, în absența unei albumine debarasată de fracțiunile globulinice, se poate folosi gelatina (ieftină, ușor de procurat) sau lizozimul (mai greu de obținut).

Concentrația proteică este stabilită în funcție și de scop, dar și de proteină. Astfel, albumina serică bovină, în concentrație de 0,1 g/100 ml tampon este utilă ca diluent. Concentrații de 40—50 de ori mai mari sînt necesare pentru unele soluții de spălare, dar costul ridicat al unei asemenea soluții a dus la înlocuirea (cînd este posibil) a albuminei cu ser de la o specie al cărui hormon omolog nu interferează în reacție, de exemplu ser de cal v/v în tampon.

Prezența albuminei în soluția tampon îi reduce durata de conservare la 5—10 zile, de aceea în trusele comerciale livrabile la distanță nu se folosesc tampoane în soluție ci liofilizate sau granulate.

5.3.3. AGENȚI PROTECTORI

Hormonii expuși degradărilor enzimatice în timpul incubării (22) sînt protejați cu ajutorul agenților blocanți ai enzimelor ca Trasylolul, acidul 6-aminocaproic sau mercaptoetanolul. De exemplu, dimercaprolul și 7-hidroxichinolin sulfatul inhibă enzima de conversie și activitatea angiotensinazei în sistemul RIA al angiotensinei (23), iar cistina și fenatrolina întîrzie degradarea oxitocinei (24). Alteori este necesară prezența unor inhibitori ai legării hormonului de unele proteine plasmatice ca acid 8-anilin-1-naftalen sulfonic, adăugat în sistemele RIA T_3 și T_4 (25) (tabelul I.5.5.).

5.3.4. SOLVENȚII ORGANICI

Stabilitatea și uniformitatea mediului de incubare pot fi grav perturbate și de reziduurile solvenților organici folosiți pentru extracția hormonilor din lichide și țesuturi ca în cazul ACTH, al steroizilor etc. Studiile

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 15.5.

Agenţi protectori folosiţi în sistemele RIA (orientativ)

Agentul protector	Sisteme RIA (exemple)	Scop
Trasylol	glucagon, Pth,	blocanţi
Acid 6-aminocaproic	calcitonină	enzimatici
Mercaptoetanol	ACTH	
Dimercaprol	angiotensina	inhibă enzima de conversie şi activitatea angiotensinazei
8-hidroxichinolin sulfat		
Cistină	oxitocină	întîrzie degradarea oxitocinei
Fenatrolină		
Acid 8-anilin-1-naftalen-sulfonic	T_3, T_4	inhibă legarea T_3 şi T_4 la proteinele plasmatice

de standardizare (26) au arătat că aceşti solvenţi diferă în funcţie de furnizor şi şarjă. Aceste diferenţe modifică substanţial valoarea blancului în dozarea steroizilor. De aceea, pînă la fabricarea reactivilor speciali pentru imunochimie (un deziderat al viitorului), trebuie controlată fiecare nouă tranşă de solvent. În lipsa altor trepte de puritate ameliorată, se recomandă folosirea solvenţilor *reagent-grade*.

5.3.5. CONCLUZII

Selecţionarea soluţiilor tampon pentru un nou sistem RIA se face prin experimentare, formarea complexelor antigen-anticorp fiind testată în funcţie de pH, forţa ionică, concentraţie proteică etc.

Un mediu de incubare inadecvat poate perturba stabilitatea ligandului (marcat şi nemarcat), formarea complexelor antigen-anticorp, separarea liberului de legat, panta curbei doză-răspuns, sensibilitatea, exactitatea şi precizia rezultatelor, aşadar întregul proces de cantificare.

5.4. TEHNICI DE SEPARARE

Concentraţia reactivilor în sistemele RIA este atît de redusă încît complexele antigen-anticorp formate rămîn solubile şi deci nu sînt sedimentabile prin centrifugare. De aceea a fost necesară dezvoltarea unor tehnici adecvate pentru separarea complexelor antigen-anticorp de antigenul liber.

5.4.1. DEFINIŢIE, PERFORMANŢE, CRITERII DE SELECŢIE

Tehnicile de separare sînt o categorie de procedee de laborator destinate izolării unor complexe macromoleculare, complexe antigen-anticorp, de molecule mai mici — antigenul liber.

O astfel de tehnică trebuie să realizeze separarea completă şi rapidă a antigenului legat de anticorp de antigenul liber (marcat şi nemarcat), astfel încît să poată fi măsurată corect radioactivitatea, fie a uneia, fie a ambelor faze. Procedeele de separare care favorizează asocierea sau disocierea reacti-

Scanned with OKEN Scanner

vilor după încheierea fazelor de incubare aduc mari prejudicii preciziei dozării. O metodă de separare corectă trebuie să fie reproductibilă, maniabilă și economică.

O tehnică ideală ar trebui să realizeze separarea perfectă a complexelor antigen-anticorp de antigenul liber, iar radioactivitatea înregistrată pentru cele două compartimente să le reprezinte strict. În practică însă, nu dispunem de o tehnică universal aplicabilă oricărui sistem RIA, nici perfectă din punctul de vedere al scopului.

Selecția unei tehnici de separare adecvată unui anumit sistem RIA are în vedere natura, mărimea moleculară, încărcarea și solubilitatea antigenului, precum și titrul și afinitatea anticorpului.

Tabelul I.5.6. prezintă diferitele tehnici de separare folosite în RIA. Marea diversitate a acestor tehnici este rezultatul imaginației și îndemînării cercetătorilor, dar și al necesității (27). O singură tehnică de separare nu este suficientă din multiple cauze: diversitatea proprietăților chimice ale antigenelor, titrul și afinitatea antiserurilor, numărul variabil al probelor per serie (zeci, sute, mii), unele exigențe particulare ale truselor comerciale diferite de procedeele uzuale, unele necesități legate de automatizare ș.a.

Tabelul I.5.6

Tehnici de separare folosite în RIA. Clasificarea pe criteriul componentei vizată de tehnica de separare (28)

I. Adsorbția *antigenului* liber pe sorbenți insolubili
- A. Celuloză pulbere (ca atare sau coloane)
- B. Cărbune:
  - — neîncărcat
  - — încărcat cu dextran, albumină, Ficoll, polivinil-pirolidon, gelatină, hemoglobină etc.
- C. Silicați:
  - — talc — pulbere sau tablete
  - — gel de siliciu precipitat (Quso G-32)
  - — acid silicic
  - — pămînturi activate: caolin, bentonită
- D. Schimburi de ioni:
  - — rășini anionice
  - — rășini cationice
- E. Diverse:
  - — materiale pe bază de alumină
  - — materiale pe bază de magnezie
  - — florizol
  - — latex
  - — gel de poliacrilamidă

II. Izolarea *complexelor Ag-Ac*
- A. Precipitare
  - — cu săruri: sulfat de sodiu
    sulfat de amoniu
  - — fracționarea cu solvenți organici:
    alcool ± NaCl
    alcool + acetat de amoniu
    dioxan
    acetonă
    precipitarea Ag-Ac cu polimeri solubili în apă
    — polietilenglicol (carbowax)
- B. Precipitare imunochimică
  - — anticorpi anti IgG (dublu anticorp)
  - — proteina A a stafilococului

III. Separarea în fază solidă prin fixarea *anticorpului*

A. Conjugarea covalentă a anticorpului cu polimeri de hidrați de carbon:
dextran
celuloză pulbere sau rondele

B. Adsorbția anticorpului pe materiale plastice (polistiren)
— eprubete
— plăci cu godeuri
— discuri

C. Anticorp polimerizat

D. Complexarea anticorpului pe particule feromagnetice

IV. *Mixte*

A. Migrare diferențiată a celor două compartimente
— Electroforeză: celuloză, acetat de celuloză, gel de agar, de amidon, de poliacrilamidă
— Cromatoelectroforeză
— Cromatografie ascendentă uscată

B. Partiție (sită inversă)

C. Proteoliza enzimatică a antigenului liber urmată de precipitarea Ag-Ac cu acid tricloracetic

---

Luînd ca bază de clasificare componenta sistemului RIA vizată de tehnica de separare, distingem patru mari clase de tehnici (tabelul I.5.6.), la a căror selecție se ține seama de aplicabilitatea lor și de avantajele și dezavantajele rezultate din experimentare (tabelul I.5.7.).

Tabelul I.5.7.

Avantaje și dezavantaje ale tehnicilor de separare (28)

Avantaje	Dezavantaje
A. *Separarea prin migrare diferențială*	
Procedee analitice, permit examinarea calității *Ag, utile pentru urmărirea alterării *Ag în timpul incubărilor	Consumă timp; greu aplicabile seriilor mari. Nu sînt procedee de rutină.
Cromatoelectroforeză Permite aprecierea calității *Ag și corecția pentru fracțiunea alterată în fiecare probă. Folosind ca metamer de răspuns raportul B/F, manevrele strict cantitative sînt evitate. Recomandabilă ca tehnică de referință pentru separarea optimală a celor două compartimente	Consumă timp și ocupă spațiu; supusă variațiilor date de diferitele loturi de hîrtie; susceptibilă la erorile datorate *Ag alterat; aplicabilă antigenelor care se adsorb adecvat pe hîrtia cromatografică; volumul mic aplicat pe o bandă, necesită AS mari ale *Ag pentru a asigura determinarea corectă a radioactivității
Electroforeza Nu are avantaje speciale față de alte tehnici	Nu este larg folosită
Filtrarea în gel Analitică	Consumă timp; fracțiunile finale nu au volume convenabil de mici pentru a se citi radioactivitatea
Cromatografia Relativ simplă	Nu are aplicabilitate largă

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul I.5.7. (continuare)

Avantaje	Dezavantaje
B. *Adsorbția antigenului marcat liber*	
Una dintre tehnicile cele mai convenabile cu aplicabilitate majoră pentru Ag cu GM mică și cu afinitate mare pentru sorbent	
Cărbune-dextran	
Tehnică convenabilă, simplă, rapidă, reproductibilă, permite precizie și sensibilitate adecvate. Optimă pentru Ag cu GM mică: hormoni tiroidieni și steroizi, vit. B_{12}, peptide mici. A fost folosită și pentru polipeptide medii: HGH, HPL, TSH, FSH	Poate disocia complexul *H legat în special în sisteme CBPA (reactiv de legare natural), dacă nu se aplică unele măsuri preventive; limitată la Ag mici și medii. Distribuția manuală nu permite serii de dozare mai mari de 100 de eprubete
Talc și silicați	
Utili pentru peptide mici și mari	Adsorbentul trebuie tabletat
Schimbători de ioni	
Folosiți pentru Ag a căror încărcare nu permite legarea de alți adsorbenți de ex. peptide acide ca gastrina rapid captată de rășini anionice	Folosire limitată
C. *Precipitarea complexelor Ag-Ac*	
(i) Precipitarea IgG cu: sulfat de sodiu sau de amoniu, dioxan, polietilenglicol, etanol-NaCl sau proteoliză enzimatică a Ag liber, urmată de precipitarea complexelor Ag-Ac cu acid tricloracetic	
Utilă pentru molecule mici ca steroizii și peptidele mici	În sistemele cu Ag cu GM mare precipită parțial și Ag liber
(ii) Precipitarea imunochimică a IgG: — tehnica cu dublu anticorp varianta cu pre-precipitare și postincubare — tehnica cu proteina A a stafilococului	
Tehnica cu dublu anticorp este aplicabilă Ag de orice mărime moleculară și oricărui antiser, indiferent de titru Precipitare selectivă a complexelor Ag-Ac Pot fi efectuate serii mari Tehnica cu proteina A a stafilococului este aplicabilă antigenelor de orice mărime moleculară	Varianta cu postincubare necesită prelungirea duratei de lucru cu încă cel puțin 24 de ore. Variații ale calității diferitelor loturi de la al doilea anticorp pot genera rezultate variabile ale dozării Tehnică recentă (29, 30), încă insuficient experimentată
D. *Separarea în fază solidă*	
Tehnici cu anticorpul preparat sub formă insolubilă, prin conjugare cu polimeri de stiren sau de hidrați de carbon (dextran, celuloze) cu variante: pulberi, discuri, eprubete, antiser polimerizat	
Simplicitate Reducerea duratei analizei Adecvate pentru procedee în condiții de dezechilibru imunochimic și pentru automatizare	Consumă mai mult anticorp decît alte metode

5.5. CONDIȚII DE INCUBARE

Pentru fiecare nou sistem RIA se stabilesc intervalele, temperatura și volumul de incubare după criterii specifice.

5.5.1. DURATA

Sînt sisteme RIA care pot fi efectuate într-un singur timp, adică antigenul marcat și nemarcat sînt incubate simultan cu antiserul corespunzător. În acest caz, durata incubării trebuie astfel stabilită încît reacția antigen-anticorp să ajungă la echilibru. Sînt totuși și excepții cum sînt sistemele RIA, în care substanța de măsurat se află în cantități mari (HPL, HCG etc.).

În general, dacă în cadrul aceleiași serii de dozare standardul și necunoscutele sînt prelucrate în mod identic, atunci realizarea echilibrului nu mai este necesară.

Timpul necesar pentru reacția de asociere-disociere depinde, atît de antigen, cît și de antiserul folosit într-un sistem RIA și de aceea trebuie evaluat pentru fiecare nou sistem de dozare.

5.5.2. TEMPERATURA

Pentru fiecare nou sistem RIA se tatonează temperatura de incubare pe criteriul sensibilității, adică se alege acea temperatură la care sensibilitatea este maximă. De reținut, ca o regulă generală, că incubarea la temperaturi joase (de exemplu +4°C) necesită o durată mai lungă a incubării pentru atingerea echilibrului. În plus, anticorpii a căror energie de reacție este dependentă de temperatură, necesită un control precis al temperaturii de incubare, deoarece variații de 1°C pot duce la scăderea cu 5% a valorii constantei de echilibru, ceea ce poate avea repercusiuni asupra sensibilității sistemului (31). Controlul temperaturii este obligatoriu și în cursul fazelor de separare și de centrifugare.

Multe antiseruri anti-haptene nu sînt dependente de temperatură și deci temperaturile joase nu sînt necesare; incubarea se poate face la temperatura ambiantă iar, în unele cazuri, la 37°C.

5.5.3. VOLUMUL

Regula generală este eliminarea pe cît posibil a apei din sistemul de reacție (31). Volumele de incubare mari (peste 600 µl) necesită concentrații mai mari ale anticorpului și ale ligandului marcat și sensibilitatea scade. În plus, volumele de incubare mici aduc un plus de economie a reactivilor.

BIBLIOGRAFIE

1. **Jerne N. K., Wood E. C.** — Biometrics, 1949, *5*, 273.
2. **Jerne N. K., Perry W. L. M.** — Bull. W. H. O., 1956, *14*, 167.
3. **Bangham D. R., Grab B.** — Bull. W. H. O., 1964, *31*, 111.
4. **Berson S. A., Yalow R. S.** — Clin. chim. Acta., 1968, *22*, 59.
5. **Odell N. D., Charters A. C., Davidson W. D., Thomson J. C.** — J. clin. Endocr., 1968, *28*, 1 840.

Scanned with OKEN Scanner

6. **Midgley A. R.** — Acta endocrinol., 1969, *142* (Suppl.), 163.
7. **Bangham D. R., Cotes P. M.** — Brit. med. Bull., 1974, *30*, 12.
8. **Cotes P. M.** — In: „Radioimmunoassay and related procedures in medicine", IAEA, Viena, 1974, p. 71.
9. **Ekins R. P.** — Brit. Med. Bull., 1974, *30*, 3.
10. **Borth R.** — Contraception, 1975, *12*, 373.
11. **Henderson J. R.** — Lancet, 1970, *2*, 545.
12. **Yalow R. S., Berson S. A.** — In: „Principles of Competitive protein Binding Assays" (editat de W. D. Odell și W. H. Daughaday), Lippincott Co., J. B. Philadelphia — Toronto, 1971, p. 374.
13. **Jørgensen K. R.** — Acta endocrinol., 1960, *60*, 327.
14. **Yalow R. S., Hall K., Luft R.** — J. clin. Endocr., 1975, *41*, 638.
15. **Allen J. P., Kendall J. W., Gilors R. Mc., Vancura G.** — J. clin. Endocr., 1974, *38*, 586.
16. **Kleeregaper M., Donald R. A., Sposen S.** — Lancet, 1972, *1*, 74.
17. **Coculescu M., Oprescu Maria, Ioaniţiu D., Matulevicius V.** — Symp. of the Internat. Soc. of Psychoneuroendocrinology, Visegrad 1975, Akademiai Kiado, Budapesta, p. 233.
18. **Simionescu Ligia, Coculescu M., Oprescu Maria, Dimitriu Victoria, Jäger A.** — International Symposium on Prolactin, Nisa, 20—23. X. 1977, Abstracts volume.
19. **Walker R. F., Read G. F., Riad-Fahmi D.** — In: „Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and related procedures in Medicine", Berlin (vest), 31. X—4. XI. 1977.
20. **Gewirtz G., Yalow R. S.** — J. Clin. Invest., 1974, *53*, 1 022.
21. **Orsetti A.** — In: „IAEA Panel on Standardization Procedures", Viena, 1972.
22. **Malvano R., Galbiati A., Zucckelli C. C.** — J. Nucl. Biol. Med., 1975, *19*, 94.
23. **Haber E., Koerner T., Page L. B., Kliman B., Purnode A.** — J. clin. Endocr., 1969, *29*, 1 349.
24. **Kagan A., Glick S. M.** — In: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press, New York, 1974, p. 173.
25. **Holander C. S., Shen Khan L.** — In: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press, New York, 1974, p. 215.
26. **Scassellati G. A.** — In: „IAEA Panel on Standardization Procedures", Viena, 1972.
27. **Yalow R. S.** — Circulat. Res., 1973, *32*, 116.
28. **Simionescu Ligia** — In: „Compuşi marcaţi şi radiofarmaceutici cu aplicaţii în medicină" (A. Balaban, I. Gălăţeanu, L. Simionescu, G. Georgescu), Ed. Acad. R.S.R., 1979.
29. **Jonsson S., Kronvall G.** — In: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, *2*, p. 287.
30. **Jonsson S.** — In: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Internat. Symp. Berlin (vest), 1977.
31. **Walker W. H. C., Klane P. M.** — In: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York — Basel, 1977, p. 87.

Scanned with OKEN Scanner

6

REZULTATE ŞI SUPRAVEGHEREA CALITĂŢII SISTEMELOR RIA

Parcursul realizării unui sistem RIA este alcătuit dintr-o serie de etape (tabelul I.6.1.). Aceste etape au importanţă în mod egal numai pentru creatorii şi producătorii sistemelor RIA, practicienii recurgînd în majoritatea ca-

Tabelul I.6.1.

Etapele realizării unui sistem RIA

I. *Etape preliminare*
- (i) Producţia antiserului
  - — prepararea imunogenului
  - — alegerea speciei de animale, a formei şi schemei de imunizare
  - — testarea, standardizarea şi conservarea antiserului
- (ii) Prepararea antigenului marcat
  - — alegerea izotopului
  - — alegerea metodei şi condiţiilor de marcare
  - — purificarea şi testarea purităţii
  - — caracterizare şi conservare
- (iii) Obţinerea preparatului standard
  - — foarte purificat, parţial purificat, nepurificat
- (iv) Selecţionarea metodei de separare
- (v) Stabilirea condiţiilor de incubare
  - — stabilirea concentraţiei reactivilor
  - — mediul
  - — volum
  - — temperatură
  - — durata incubării
- (vi) Optimizarea sistemului de dozare
- (vii) Validarea de laborator şi clinică a sistemului

II. *Tehnica propriu-zisă*
- (i) Distribuţia reactivilor
- (ii) Incubarea
- (iii) Separarea celor două compartimente
- (iv) Măsurarea radioactivităţii (liberă, legată sau ambele)
- (v) Calculul rezultatelor
  - — curbă standard prin inscriere manuală sau prin computerizare
- (vi) Controlul calităţii

Scanned with OKEN Scanner

zurilor la truse comerciale finite sau la truse din prefabricate cum sînt cele oferite de O.M.S. prin „National Institute for Biological Standards and Control" din Anglia sau de NIH—NIAMDD „Pituitary Distribution Program" din SUA.

6.1. CALCULUL REZULTATELOR

6.1.1. CITIREA RADIOACTIVITĂȚII

Protocolul pentru determinarea radioactivității probelor nu a fost standardizat pe criterii precise (1). Din experiența diferitelor laboratoare se pot desprinde totuși cîteva reguli generale.

(i) Cînd s-a stabilit că precizia pipetării se poate menține la 1% (CV)*, nu mai este necesar să se determine radioactivitatea totală în toate probele ci numai în cîteva eprubete;

(ii) Eprubetele cu care se citește radioactivitatea totală sînt alese la întîmplare, fie dintre probele din seria de lucru, fie se plasează eprubete, care conțin numai ligand marcat, oriunde în cadrul seriei de lucru (la început, la sfîrșit sau în interiorul seriei);

(iii) Este redundant și neeconomic să se determine radioactivitatea ambelor fracțiuni: liberă și legată.

(iv) Pentru citirea radioactivității se va alege acea fracțiune care conține cel mai mic număr de impulsuri.

(v) Cu cît activitatea specifică a radioligandului este mai mare, cu atît precizia generală a măsurării este mai bună.

(vi) Timpul de citire pentru o probă este astfel ales încît eroarea de determinare a radioactivității să se mențină în limitele 1—3% (CV) (precizia generală de $\pm$ 1DS).

6.1.2. CURBA STANDARD

Ca și în alte sisteme (biologice, chimice) și în sistemele RIA, cantificarea probelor necunoscute se face cu ajutorul unei curbe doză-răspuns. Pentru aceasta sînt necesare două opțiuni: intervalul adecvat al gamei dozelor standard și modul de reprezentare a axelor de coordonate. Doza, reprezentată de diluțiile seriate din preparatul standard se desfășoară pe intervale de concentrații variate. Intervalul optim de concentrații este ales oarecum arbitrar; în practică sînt incluse, fie concentrațiile care definesc cel mai bine forma globală a unei curbe de calibrare, fie acele concentrații pentru care se obține cea mai bună precizie (1). Serierea concentrațiilor se poate face, fie în serie aritmetică (1, 2, 3,. . .), fie în cea geometrică (1, 2, 4, 8, 16, . . .), se poate alege deci abscisă liniară sau logaritmică. Logaritmarea scalei dozelor (x) are avantajul că pot fi interpolate corect și concentrațiile mari. Sînt totuși și dezavantaje: punctul zero nu mai este inclus, ceea ce constituie un impediment cînd majoritatea necunoscutelor au tendința către valori mici, și nu se mai poate face compararea curbelor cînd radioligandul prezintă variații de la o serie la alta, deoarece aceste variații modifică panta curbei (1).

*CV=coeficient de variabilitate.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru reprezentarea scalei variabilei de răspuns (y) au fost folosite o varietate de transformări, toate cu scopul de a liniariza curba doză-răspuns (fig. I.6.1. a-f). Reactivul principal al sistemelor RIA — antiserul — este cel care determină curbarea cu convexitatea spre origine a curbelor (fig. I.6.1.,

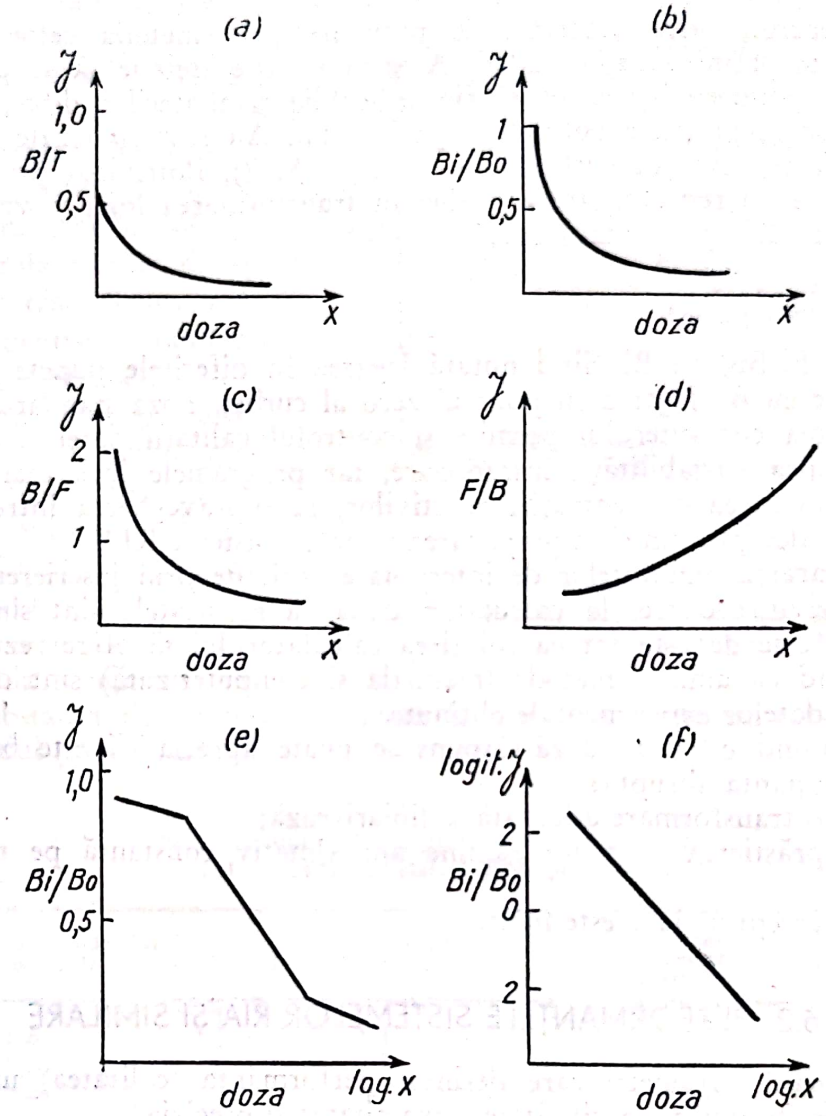


Fig. I.6.1. a, b, c, d, e, f. Forma curbei doză-răspuns în diferite reprezentări ale axelor de coordonate.

a, b, c) datorită neomogenității în afinitatea populației de *situs*-uri de combinare (2, 3). Alegerea unui anumit mod de reprezentare este orientată în special de intenția de a reduce la minimum împrăștierea în jurul mediei și de a reuși interpolarea necunoscutelor pe o gamă cît mai largă de concentrații. De reținut că într-o serie de determinări de HGH, valorile serice ale bolnavilor hipofizari se pot extinde pe o gamă de concentrații de patru ordine de mărime: de exemplu 0,1 μU/ml la un nanic și 1 000 μU/ml la un acromegal.

Dacă intervalele de concentrații sînt suficient de apropiate, se poate trasa curba manual, cu ajutorul unei rigle flexibile, aplicînd-o pe punctele cu

o variabilitate cît de cît uniformă, această înscriere seamănă bine cu cea trasată de inscriptorul (ploterul) unui computer.

Înscrierea curbelor standard cu ajutorul computerului are o serie de avantaje şi este în mod special utilă pentru laboratoarele care prelucrează serii mari.

În general, orice algoritm de potrivire prin metoda celor mai mici pătrate poate defini ecuaţia curbei. Această ecuaţie trebuie să se potrivească punctelor şi ponderii lor adică să fie aplicabilă şi abaterilor diferitelor părţi ale curbei de la punctele obţinute experimental. Au fost elaborate o serie de programe de potrivire a curbelor (4, 5, 6, 7, 8, 9). Potrivirea prin cele mai mici pătrate la o reprezentare a curbei în transformarea logit y versus log y (4) a cîştigat o acceptare mai largă.

$$\text{Logit } y = \ln \frac{y}{(1-y)},$$

unde: y = Bi/Bo, cu Bi fiind notată legarea în diferitele puncte ale curbei standard, iar cu Bo legarea în punctul zero al curbei (doza standard = zero).

Folosirea computerului permite şi controlul calităţii datelor, furnizează indicaţii asupra variabilităţii intradozare, iar programele încă mai elaborate servesc la stabilirea concentraţiei reactivilor, la supravegherea întregii desfăşurări a metodei, precum şi la proiectarea unor noi sisteme RIA.

Compararea rezultatelor de interpolare obţinute prin înscrierea manuală şi prin potrivirea curbei la calculator arată că rezultatele sînt similare (1). Evident, nu este de aşteptat ca folosirea calculatorului să ofere rezultate mai precise, ştiind că ambele metode (manuală şi computerizată) sînt dependente de calitatea datelor experimentale obţinute.

Examinînd o curbă doză-răspuns se poate aprecia că este bună dacă:

— are panta abruptă;

— la o transformare adecvată se liniarizează;

— împrăştierea valorilor rămîne aproximativ constantă pe tot traseul curbei;

— interceptul* la y este înalt.

6.2. PERFORMANŢELE SISTEMELOR RIA ŞI SIMILARE

Principalii parametri care definesc performanţa (calitatea) unui sistem RIA sînt: sensibilitatea, specificitatea, exactitatea şi precizia.

Sensibilitatea este definită ca cea mai mică cantitate de substanţă, dozată într-un sistem, statistic diferenţiabilă de doza zero. Această valoare este echivalentă cu precizia sistemului în vecinătatea punctului zero al curbei standard.

Sensibilitatea depinde de constanta de afinitate K a anticorpului şi de activitatea AS a radioligandului şi anume, ea este cu atît mai bună (cantitatea diferenţiabilă de zero cu atît mai mică) cu cît panta este mai abruptă şi cu cît precizia este mai mare.

Teoretic, sensibilitatea predictibilă este 1/K sau K^{-1}. Au fost elaborate şi formule pentru calculul sensibilităţii sistemelor RIA (1).

* Interceptul reprezintă distanţa de la origine la un punct al uneia din axele de coordonate.

Scanned with OKEN Scanner

Specificitatea este un parametru generat de calitatea proteinei de legare (anticorpul în cazul RIA). Un sistem RIA specific este cel capabil să facă abstracţie de substanţele structural similare cu substanţa-scop a sistemului.

Pentru fiecare nou sistem RIA se specifică gradul de interferenţă cu substanţe similare, mai ales cînd sistemul este destinat uzitării mai largi sau comercializării.

Exactitatea defineşte gradul de corespondenţă între substanţa pe care o dozăm şi preparatul de referinţă sau standardul folosit pentru construirea curbei standard. Metoda de elecţie pentru stabilirea exactităţii este metoda paralelismului între curba standard şi o curbă construită cu concentraţii seriate din substanţa de dozat (fig. I.6.2). Panta poate fi calculată grafic sau la computer (9). O altă cale este metoda recuperării dozei de substanţă de analizat adăugată la cîteva niveluri de concentraţie ale standardului (tabelul 1.6.2).

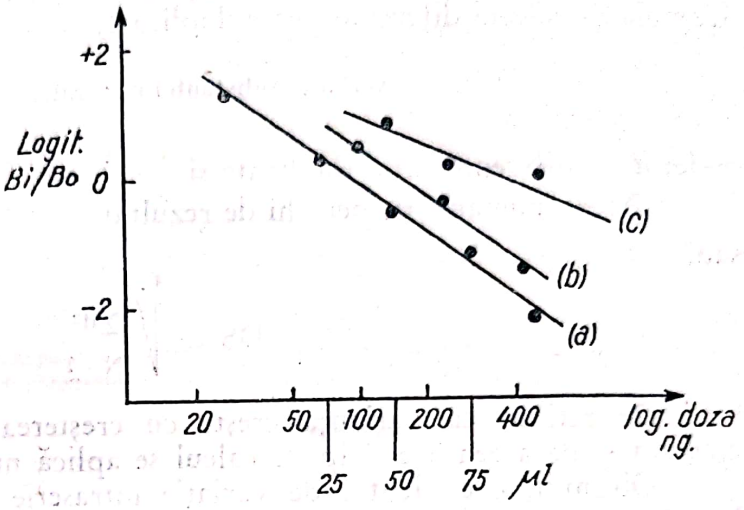


Fig. I.6.2. Testarea paralelismului între curba standard *a)* un ser de gravidă *b)* şi un extract brut de placentă *c)* într-un sistem RIA pentru HPL.

Tabelul I.6.2.

Proba recuperării pentru verificarea prezenţei LH în LCR, în sistem RIA pentru LH

Concentraţia standardului (în mU/ml)	Concentraţia găsită în LCR (în mU/ml)	Concentraţia însumată (în mU/ml)	Recuperare (în %)
1,5	1,1	2,4	82
3,0	2,6	5,3	92
12,5	4,3	17,7	116

Exceptînd substanţe ca steroizii, pentru care substanţa analizată într-un lichid biologic este structural identică cu standardul, în RIA pentru polipeptide rareori întîlnim această identitate. De exemplu, preparatul standard este un hormon de origine hipofizară, iar sistemul serveşte dozărilor în urină, sînge sau LCR, de unde nu se pot obţine cantităţi suficiente pentru a prepara un standard.

Precizia (repetabilitatea sau reproductibilitatea) este definită ca o măsură a concordanţei unei serii de valori obţinute pentru o singură probă, cu valoarea medie a seriei (11).

Precizia depinde de extensia schimbării (Δy) variabilei de răspuns (y) la modificări (Δx) în concentraţia dozei (x). Spre deosebire de sensibilitate, precizia este independentă de constanta de echilibru (K).

Scanned with OKEN Scanner

Precizia *intraserie* a punctelor curbei *standard* poate fi definită teoretic (12) ca o însumare a variaţiei fiecărei trepte individuale: pipetare, incubare, separare şi citirea radioactivităţii. Programele pentru computer conţin ecuaţiile care definesc acest tip de precizie.

Precizia *intraserie* a probelor *necunoscute* se obţine lucrînd cu probe în duplicat, fie întreaga serie, fie un eşantion suficient de mare pentru a aplica formula calculului diferenţei între duplicate:

$$\text{varianţa substanţei măsurate} = \frac{\Sigma d^2}{2N},$$

unde: d = diferenţa între duplicate şi
N = numărul de perechi de rezultate

sau:

$$DS = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{N-1}}$$

De reţinut că varianţa creşte cu creşterea concentraţiei substanţei de măsurat şi de aceea acest tip de calcul se aplică numai unor date grupate.

Obişnuit, coeficientul de variaţie intraserie al unui sistem RIA este de 5—15%.

Precizia *interserii* este mai redusă decît cea intraserie, deoarece se adaugă variabile suplimentare, cum sînt îmbătrînirea radioligandului, schimbarea condiţiilor de incubare, înlocuirea operatorului etc. Coeficientul de variaţie interserii este de 10—20% (13).

Acest tip de precizie poate fi supravegheat cu ajutorul unor amestecuri de probe biologice; cîte un amestec pentru concentraţiile mari, mijlocii şi mici. Aceste amestecuri (*pool*-uri) se menţin congelate sau liofilizate în porţii mici şi se introduc cu fiecare serie de dozare. Diferenţa între rezultatele obţinute în aceste seruri de control, în dozarea în serii diferite, nu trebuie să depăşească intervalul de ± 3 DS faţă de o valoare medie considerată corectă.

Precizia *interserii* este mai mare decît cea intraserie, deoarece se adaugă necesită un control permanent.

În practica RIA, cînd se efectuează determinări în lichide sau ţesuturi biologice care conţin cantităţi mari de hormoni, cum sînt ţesuturile glandulare, precizia determinării este mult mai importantă decît sensibilitatea sistemului.

6.3. STANDARDIZAREA SISTEMELOR RIA

Recomandările de standardizare (14, 15, 16) se referă la lucrul în *laborator* şi sînt aplicate anumite reguli reactivilor, probelor biologice, condiţiilor de incubare, tehnicii de separare, de măsurare a radioactivităţii, de calcul, de exprimare a rezultatelor etc. O altă serie de recomandări au ca adresă etape care se desfăşoară *în afara laboratorului*, ca de exemplu stabilirea normalităţii, selecţionării şi pregătirii bolnavului, prelevării şi codificării probelor biologice, interpretării rezultatelor (tabelul I.6.3). Aceste recomandări implică

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul I.6.3.

Standardizarea sistemelor RIA pentru hormoni (17)

Faza de lucru	Criteriul de standardizare	Recomandări
Prelucrarea probelor biologice	Reducerea variaţiilor de prelucrare	Condiţii uniforme de separare a serului, plasmei. Tehnici uniforme de extracţie aplicate serului, plasmei, urinii, LCR, salivei, ţesuturilor
Conservarea probelor biologice	Evitarea pierderii activităţii hormonale	Congelare la o temperatură adecvată (sub —20°C)
Metoda de dozare	Asigurarea specificităţii, exactităţii şi sensibilităţii şi preciziei sistemului. Reducerea variabilităţii intra- şi interserii	Aplicarea criteriilor de standardizare fiecărui reactiv, tehnicii de separare, de măsurare, de calcul, metodei în ansamblu
Exprimarea rezultatelor	Favorizarea comparabilităţii rezultatelor	Pentru hormoni conform recomandărilor O.M.S. (Tehnical Report Series 565/1975 şi The SI for the health professions, 1977)
Interpretarea rezultatelor	Evitarea rezultatelor greşite	Evaluarea tuturor parametrilor care pot influenţa rezultatul: vîrstă, sex, stare fiziologică şi psihologică, ritmuri biologice, alimentaţie, medicamente etc. Compararea cu valorile normale stabilite pentru populaţia căreia îi aparţine pacientul

legături funcţionale permanente între laborator şi departamentele clinice sau experimentale (fig. I.6.3).

Pentru o bună standardizare, este necesar să fie bine cunoscute sursele de eroare care pîndesc pe tot traseul pacient-medic-laborator-pacient (tabelul I.6.4.).

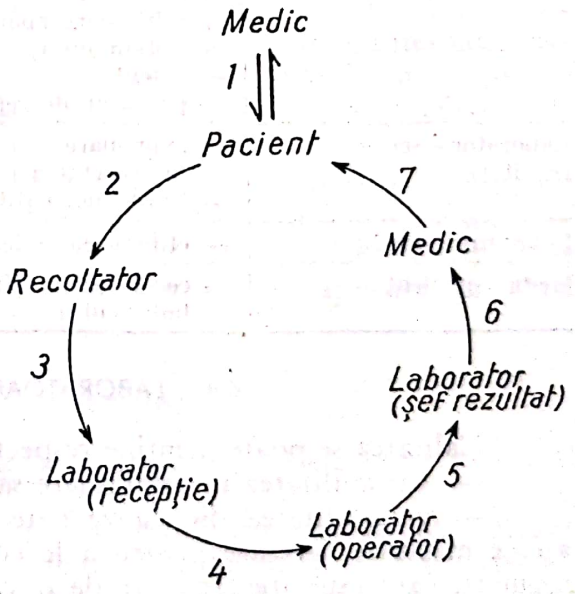


Fig. I.6.3. Etape expuse erorilor în circuitul pacient-medic-laborator-pacient.

6.4. CONTROLUL CALITĂŢII REZULTATELOR

Conceptul controlului statistic al calităţii rezultatelor datează de aproape trei decenii (18) şi este aplicabil oricărei producţii de serie. Teoretic, în producţia de serie, articolele rezultate ar trebui să fie identice, dar în realitate există mici abateri de la specificaţiile admise. Variabilitatea observată a fost clasificată (18) în *variabilitate întîmplătoare* — datorată suprapunerii şi interrelaţiei micilor efecte ale unor cauze prea numeroase şi tranzitorii pentru a putea fi analizate individual — şi *variabilitatea* datorată unor *cauze detectabile.*

Tabelul I.6.4.

Surse de eroare în circuitul pacient—medic—laborator—pacient (17)

Etapa	Sursa de eroare	Precauţii
Medic→pacient	— medicamente — alimentaţie — *stress* — ritmuri biologice — probă dinamică	— instruirea şi supravegherea pacientului
Pacient→recoltator	— *stress* venepuncţie — orarul prelevărilor — codificarea probei — etichetarea probei — interval expediţie	— broşuri cu instrucţiuni — ac a *demeure* — codificarea simplă, clară
Recoltator→recepţie laborator	— înregistrare — codificare	— simplificarea formelor de înregistrare
Laborator—lucru — prelucrare probe	— separare cheag, hematii — centrifugare etc. — conservare	— instructaj personal laborator
— analiza	— codificare probe — pipetare reactivi — tehnică separare — sticlărie — alterarea reactivilor — schimbarea operatorilor — măsurare — schimbare aparat — sistem interpolare — calcul — preparat de referinţă	cartele (fişe) de control
Laborator—şef→rezultate	— exprimare — interpretarea } rezultatelor — limite normalitate	
Laborator→medic	— eliberarea buletinului	
Medic→pacient	— corelarea rezultatului cu starea bolnavului	

6.4.1. LABORATOARE „SUB CONTROL"

Calitatea se poate menţine respectînd două condiţii:

— variabilitatea întîmplătoare să fie menţinută *constantă* şi

— variabilitatea din cauze detectabile să fie *semnalată* la timp şi să se aplice măsurile necesare pentru a le contracara. Procesul de elaborare al unui rezultat, care este afectat doar de o variabilitate cu nivel constant este numit *„sub control"*.

6.4.2. MĂSURI GENERALE

Analizele cu radioliganzi pun unele probleme speciale din punctul de vedere al controlului calităţii, probleme care sînt generate de instabilitatea reactivilor folosiţi în cantităţi trasoare şi de faptul că se lucrează cu reactivi

Scanned with OKEN Scanner

care nu sînt „certificaţi". Eterogenitatea reactivilor esenţiali (ligandul marcat şi antiserul) şi uneori lipsa preparatelor de referinţă necesare duc la instabilitatea calităţii rezultatelor în laboratoarele individuale şi la apariţia diferenţelor între laboratoare. Toate aceste dificultăţi sînt suficiente argumente pentru organizarea, la nivel naţional şi internaţional, a măsurilor pentru aplicarea unui control de calitate riguros (15).

O.M.S., prin experţii săi, desfăşoară o activitate susţinută cu scopul asigurării calităţii sistemelor de analiză cu radioliganzi cu aplicabilitate în medicina umană. În rapoartele tehnice asupra standardizării (14, 15) sînt prezentate detaliat recomandările pentru controlul calităţii materialelor folosite în sistemele de dozare imunochimică şi propuneri pentru un sistem naţional de „servicii" de analiză a hormonilor şi a altor substanţe necesare îngrijirii sănătăţii populaţiei. Mai mult, au fost stabilite *preparate de referinţă internaţionale* pentru determinarea imunochimică a concentraţiei acelor hormoni care sînt frecvent solicitaţi.

Laboratorul internaţional O.M.S. pentru standarde biologice cu sediul la Londra are, între altele, sarcina de a elabora standarde internaţionale, preparate de referinţă şi reactivi de referinţă (19). În plus, O.M.S. a întreprins în 100 de laboratoare, studii pilot asupra *controlului extern* al calităţii metodelor de analiză cu radioliganzi pentru o serie de hormoni steroizi şi polipeptidici.

La solicitarea O.M.S., Federaţia Internaţională a Chimiei Clinice (IFCC) a întreprins un program vast pentru controlul calităţii truselor comerciale şi a instrumentarului, precum şi pentru analiza unor *intervale de referinţă* necesare definirii *„normalităţii"* şi în scopuri de educaţie şi învăţămînt (20).

O contribuţie substanţială în domeniul standardizării şi controlului calităţii metodelor de analiză cu radioliganzi este datorată Agenţiei Internaţionale pentru Energia Atomică (AIEA), care, împreună cu O.M.S., a organizat reuniuni şi simpozioane cu această temă (21, 22, 23), precum şi cursuri de iniţiere.

Documente care conţin măsuri privind controlul calităţii produselor necesare analizelor cu radioliganzi (reactivi, truse şi instrumentar) au fost acceptate ca legi (S.U.A.) sau ca ghid orientativ (R. F. Germania) şi se preconizează ca în cîţiva ani legislaţii adecvate să fie aplicate în toate ţările Europei (15).

6.4.3. CONTROLUL DE CALITATE

În sens restrîns, controlul calităţii se limitează la acele erori care cad în responsabilitatea laboratorului (tabelul I.6.4).

În cadrul laboratorului, deosebim *autocontrolul*, efectuat de către personalul laboratorului sub supravegherea conducătorului său, şi *exocontrolul*, efectuat periodic sau ocazional de un laborator de referinţă regional (24), naţional (25, 26) sau internaţional (27).

Necesarul pentru controlul calităţii:

— standard primar;

— seruri de control rezultate din amestecuri de lichide biologice distribuite sub formă lichidă, congelate sau liofilizate, putînd servi şi ca standard secundar;

Scanned with OKEN Scanner

— tehnici de referinţă.

Tehnica autocontrolului prevede cîteva faze:

1. Se selecţionează 30—50 probe din toate nivelurile de doze întîlnite cu sistemul pe care îl controlăm, eventual amestecuri de probe care au rămas de la determinări anterioare.

2. Se stabileşte pe aceste probe precizia intraserie în două variante alternative, fie 30—50 determinări pe o aceeaşi probă (cînd avem suficient material), calculîndu-se media şi deviaţia standard după metodele uzuale, fie duplicate pe 30—50 probe, calculîndu-se deviaţia standard a diferenţelor după formula:

$$DS = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{2N}}$$

3. Precizia interserii se calculează cu ajutorul rezultatelor obţinute prin determinările făcute pe probe în duplicat incluse în mai multe serii de dozare succesive. Formula de calcul este aceeaşi ca pentru intraserie, considerînd ca un partener rezultatul unei dozări şi celălalt partener, rezultatul obţinut în dozarea următoare ş.a.m.d. Se mai poate calcula şi varianţa (DS^2) interserii.

Calculul *exactităţii* este ceva mai dificil, deoarece este necesar să se compare rezultatele obţinute într-o anumită dozare cu rezultatul dat de o metodă de referinţă (în cadrul aceluiaşi laborator sau într-un laborator de „service" regional, naţional sau internaţional). Se calculează diferenţele d_1, $d_2 \ldots$ dn între rezultatul obţinut cu metoda pe care o controlăm şi rezultatul tehnicii de referinţă efectuat pe n probe, şi se aplică formula:

$$\bar{d} = \sum \frac{di}{n},$$

sau se poate calcula varianţa diferenţelor:

$$DS^2 = \frac{\Sigma di^2 - \frac{(di)^2}{n}}{(n-1)},$$

Limitele de confidenţă 95% în δ, valoarea reală a metodei sînt date de:

$$\bar{d} \pm t \frac{DS}{\sqrt{n}},$$

unde: t = valoarea 95% a testului „t" Student cu n-1 grade de libertate. Această formulă oferă unele indicaţii asupra gradului de exactitate cu care a fost asigurată determinarea.

În absenţa unei tehnici de referinţă sau de control, ca în cazul unor laboratoare izolate sau plasate într-o atmosferă necooperantă, au fost propuse cîteva căi prin care se poate estima exactitatea rezultatelor (28).

1. Se compară rezultatele obţinute în probe, atît normale, cît şi patologice cu cele obţinute de un alt laborator care foloseşte aceeaşi metodă.

2. Se compară rezultatele obţinute în probe normale şi patologice cu cele obţinute cu o metodă de referinţă în acelaşi laborator sau în altul.

3. Se compară valorile normale cu cele care au fost publicate de alte grupuri.

4. Se supun analizei probe selecţionate, normale şi patologice, ale căror valori au fost deja stabilite.

Scanned with OKEN Scanner

5. Se adaugă substanţă pură în probe şi se calculează recuperarea (rezultatul aditiv).

6. Se fac probe de specificitate, adăugînd cantităţi variabile din substanţe, care, teoretic, ar trebui să interfereze în sistem.

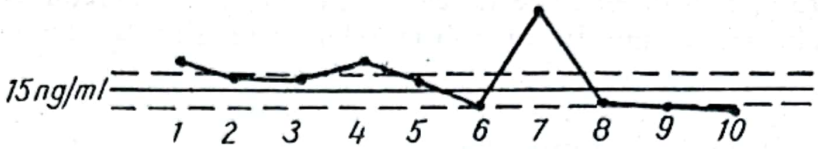


Fig. I.6.4. Harta Cusum pentru 10 curbe standard efectuate la intervale diferite, pe timp de un an, în Laboratorul de radioimunologie al Institutului de endocrinologie. Valoarea ţintă =15 ng/ml a fost determinată de mai multe ori pe acelaşi amestec de seruri, în sistem RIA-HGH.----.=2 deviaţii standard ale mediei valoriiţintă; .———.= valoarea reprezentînd însumarea abaterilor valorilor găsite la determinările 1, 2, ... 10, faţă de valoarea-ţintă. Se observă că la determinarea nr. 7, sistemul RIA a fost grav perturbat.

Controlul preciziei intraserie şi interserii pe un număr mare de probe se efectuează *discontinuu*, de exemplu interserii o dată la 4—5 serii. Practic însă, controlul poate fi efectuat *continuu* cu ajutorul replicatelor pe trei niveluri de concentraţii, cu înscrierea grafică a rezultatelor pe graficul de control. În chimia clinică sînt folosite diferite metode de grafice de control (29), de exemplu graficul sume cumulative cunoscut ca graficul Cusum (30, 31) (fig. I.6.4.).

Controlul extern (exocontrol) al calităţii se bazează pe aceleaşi principii ca şi autocontrolul sau controlul intern.

Practic, se distribuie laboratoarelor participante un număr de probe, în general nu mai mare de 20, numerotate la întîmplare. Rezultatele sînt calibrate de participanţi, fie faţă de o curbă comună pentru toţi, fie faţă de o a doua curbă trasată cu ajutorul unui eşantion standard fiolat, care este distribuit odată cu probele. Probele în triplicat sînt interpolate pe curba standard uzuală a laboratorului, pe curba comună şi pe curba construită cu ajutorul standardului primit odată cu probele. Se calculează pe triplicate variabilitatea intraserie şi coeficientul de variabilitate interlaboratoare. Rezultatele obţinute de fiecare laborator sînt înscrise pe histograma distribuţiei frecvenţelor, care, cel puţin la debutul acestui tip de control, arată dispersia foarte largă a valorilor, de exemplu între 5 şi 200 mU/l TSH, valoarea reală fiind de 17,5 mU/l (32). Histograme ale distribuţiei frecvenţelor în controlul extern au fost efectuate asupra sistemelor RIA pentru o varietate de hormoni (25, 33, 34, 35, 36).

6.5. AUTOMATELE ŞI SISTEMELE RIA

Dezvoltarea unor sisteme automate pentru efectuarea radioimunoanalizelor a însemnat o etapă aparte în evoluţia domeniului analizelor cu radioliganzi. Deşi experienţa anilor precedenţi a permis multe analogii cu sistemele multi-canal folosite în chimia şi enzimologia clinică, totuşi unele particularităţi cum sînt reactivii radioactivi au necesitat cercetări speciale.

Scanned with OKEN Scanner

Scopul metodelor RIA şi al celor similare este să măsoare o cantitate necunoscută de substanţă în minimum de timp, cu sensibilitate, exactitate şi precizie maximă, fără posibilităţi de măsluire a rezultatelor.

Numărul mare de factori care intervin într-un sistem RIA şi interacţiunile lor (37), multiplele surse de eroare în cursul manevrelor tehnice, creşterea vertiginoasă a numărului substanţelor care sînt analizate cu aceste metode şi cererea în continuă creştere pentru analize de acest tip au stimulat cercetarea posibilităţilor de realizare a unor instalaţii care să asigure automatizarea parţială sau totală a procedurilor.

6.5.1. ASPECTE TEORETICE

Automatizarea este un termen derivat din limbajul cibernetic şi implică conceptele de *control*, prin *feedback* (retrocontrol) şi de *reglare*. De aceea, un sistem de analiză automat reprezintă mult mai mult

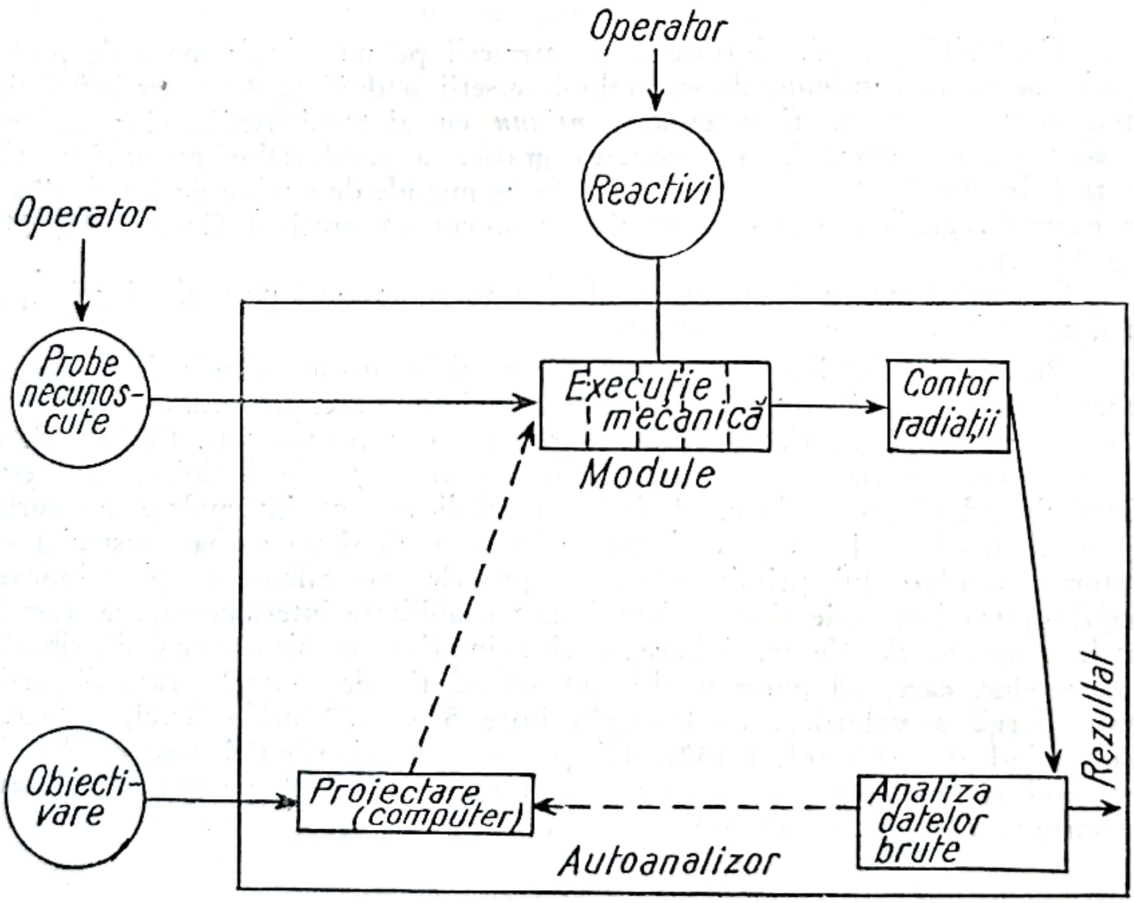


Fig. I.6.5. Elemente principale ale unui analizor autoreglabil complet automat (modificat după referinţa 7). În sistemele *parţial* automatizate, executantul intervine în una sau în mai multe faze ale execuţiei mecanice, de exemplu pentru centrifugare.

decît o maşină de pipetare, el trebuie să realizeze proiectarea unui sistem de analiză, să asigure execuţia mecanică, să efectueze prelucrarea datelor brute, să facă analiza statistică a lor şi să execute controlul calităţii (7) (fig. I.6.5.).

Scanned with OKEN Scanner

Partea cea mai importantă este realizarea unui program (*software*) pe baza unor algoritmuri (*fineware*) pentru computer, cu ajutorul căruia să poată fi realizată proiectarea adecvată a sistemului de analiză. Aspectele teoretice care stau la baza unui astfel de program sînt utile mai ales pentru realizarea unui echipament automatizat (hardware) dar şi pentru sistemele simple, neautomatizate.

Proiectarea unui sistem de analiză este elementul cheie al schemei unui sistem automatizat. Problema principală a proiectării este selecţionarea unui sistem optimal de analiză în ceea ce priveşte: concentraţia reactivilor, timpul de incubare şi de citire a radioactivităţii probei pentru a obţine sensibilitate şi precizie maximă (7). De aceea, în sistemele de calcul sînt luaţi în considerare factorii care pot influenţa precizia, factori care acţionează şi individual, dar mai ales prin interacţiunea dintre ei.

Selecţionarea *concentraţiei reactivilor* pe baze numai intuitive poate duce la proiectarea unor sisteme de analiză suboptimale, de aceea au fost emise unele premise teoretice pentru stabilirea adecvată a lor (10). Alegerea concentraţiei reactivilor, astfel încît să se obţină sensibilitatea maximă, pune probleme teoretice dificile. Pornind de la legea acţiunii maselor, au fost derivate o serie de expresii algebrice care definesc concentraţia optimă a reactivilor pentru realizarea sensibilităţii maxime a sistemului (10, 38). Astfel de relaţii algebrice pleacă însă de la unele premise simplificatoare privind în special relaţia dintre eroarea experimentală şi metamerul de răspuns al curbei standard. Obstacolele principale în calea alegerii unui model matematic adecvat sînt neliniaritatea curbei doză-răspuns (situs-uri de legare neomogene) şi repartiţia neuniformă a erorii de-a lungul curbei, eroarea fiind corelată cu cantitatea de substanţă care se măsoară.

Există sisteme de dozare (cu reactivi neomogeni) pentru care premisele schematice nu-şi menţin validitatea şi de aceea generalizarea expresiilor algebrice prezintă unele restricţii, de unde necesitatea unei reanalizări pe baza acestor formule, a fiecărui sistem RIA în parte.

Soluţiile problemelor particulare fiecărui sistem nu pot fi obţinute decît folosind calculul programat la un computer, adoptînd metode numerice. Aceasta înseamnă, în esenţă, construirea unui *model matematic* al întregului sistem de analiză, care să încorporeze şi ecuaţiile care definesc curba doză-răspuns.

Modelele matematice sînt deci de două feluri: *raţionamentale*, adică cele care pornesc de la mecanismul reacţiei antigen-anticorp aproximat prin legea acţiunii maselor şi cele *empirice*, rezultate din analiza unui număr suficient de mare de date experimentale. Relaţia dedusă din aplicarea mecanismului de interacţiune dintre antigen şi anticorp (ambele considerate univalente), a dus la construirea reprezentărilor de tip Scatchard (39), utile pentru a determina constanta de echilibru (K) şi pentru a semnala neomogenitatea populaţiei anticorpilor prin schimbarea bruscă a pantei doză-răspuns.

În realitate însă, majoritatea antiserurilor folosite în practică, deşi neomogene, sînt totuşi utile dozărilor, de aceea s-a recurs la modelul empiric, care constă din alegerea unui tip de curbă exprimată matematic printr-o funcţie empirică aleasă prin ajustarea din aproape în aproape a datelor experimentale, pînă cînd se obţine expresia grafică (respectiv analitică), ce satisface

Scanned with OKEN Scanner

un anumit sistem de dozare. Aceste funcţii pot prezenta un grad suficient de generalizare, încît pot fi aplicate mai multor sisteme RIA şi chiar sistemelor de analiză CBPA şi RRA (4, 7, 32, 40).

Prin alegerea *tipului de curbă* se rezolvă aspectul *semicantitativ* al problemei, iar prin conferirea unor valori numerice parametrilor, tipul de curbă este particularizat printr-un anumit algoritm şi poate fi transmis unui computer.

Prin reprezentarea grafică a curbelor standard experimentale, relaţia doză-răspuns apare sub mai multe forme: hiperbolă sau sigmoidă, în coordonate aritmetice, dreaptă sau dreaptă sigmoidă la capete, în coordonate transformate. Expresiile matematice care aproximează suficient de adecvat aceste tipuri de curbe sînt deduse matematic (*fineware*) şi alcătuiesc baza *rutinelor* pentru calculatorul electronic (tabelul I.6.5).

Tabelul I.6.5.

Funcţii analitice pentru aproximarea curbei standard

Funcţia	Metoda de ajustare	Forma curbei	Referinţă
$\text{logit } y = \log e \left(\frac{y}{1-y}\right)$ relaţie liniară de tipul logit (y)= a+b log × unde: y = Bi/Bo x = concentraţia substanţei de măsurat; a, b = constante determinate empiric pentru fiecare sistem de dozare	cele mai mici pătrate	dreaptă sau dreaptă şi sigmoidă la capete	(4)
$1/(y+c)=ax+b$ unde: a, b, c = parametri; y = radioactivitatea măsurată corespunzătoare cu x = concentraţia substanţei de măsurat	cele mai mici pătrate	dreaptă	(4)
funcţie putere în y (pornită de la transformarea logit/log) aproximată cu o ecuaţie cu 5 parametri (coeficienţi) $x_5(y)=(1/y)\,(c_0+c_1y+c_2y^2+c_3y^3+c_4y^4)$		hiperbolă	(5)
$y=(a+bx+cx^2)/(x+d)$ unde: y = fracţiunea legată; x = concentraţia substanţei de dozat	cele mai mici pătrate	dreaptă	(6) (7)
Polinom cubic $y=a+bx+cx^2+dx^3$ Segmentele de curbă între punctele curbei standard sînt descrise de funcţia: $f(x)=ai+bi\,(x-xi)+ci\,(x-xi)^2+di\,(x-xi)^3$	parametrii *ai*, *bi*, *ci* şi *di* sînt variaţi într-o pantă iterativă pînă ce segmentele curbei (derivata a doua) sînt continue la capete, adică urmăreşte continuitatea întregii funcţii de racordare şi a derivatei de ordinul întîi	logistică (sigmoidă)	(8) (32)

Scanned with OKEN Scanner

Practica arată că influenţe „nestăpînite" pot genera valori „deşuchiate", care sar departe de curba standard; pentru eliminarea lor sînt folosite expresii algebrice care devin *subrutine* ale programelor. Tot ca subrutine sînt incluse algoritmurile, care permit „disecţia" erorilor sau care analizează interacţiunea surselor de eroare. Alte subrutine calculează parametrii statistici pentru estimarea liniarităţii, a limitelor de confidenţă şi a paralelismului curbelor. Concentraţiile necunoscutelor sînt calculate din ecuaţia curbei stabilită cu acele valori numerice ale parametrilor care dau cea mai bună potrivire cu datele experimentale. Programe adiţionale stabilesc condiţiile pentru realizarea unei sensibilităţi optimale sau calculează reprezentarea Scatchard pentru determinarea omogenităţii sau eterogenităţii proteinei de legare. Orice alte rutine adiţionale pot fi incluse în programul general, ca de exemplu pentru disecţia aspectelor cinetice (7, 40, 41) sau de termodinamică (1, 42).

6.5.2. INSTALAŢII PENTRU AUTOMATIZAREA RIA

De la prima măsurare a concentraţiei insulinei în anul 1959 pînă astăzi, numărul substanţelor analizate prin metode cu radioliganzi trece de 500. În Europa de vest creşterea anuală a numărului determinărilor RIA este de 60% (42). Ritmul creşterii înregistrat în laboratorul condus de autoare este prezentat în fig. I.6.6.

Programele naţionale de sănătate solicită efectuarea în mod sistematic a determinărilor pentru unele substanţe hormonale şi nehormonale. Cîteva exemple sînt ilustrative: antigenul Australia la donatorii de sînge, HPL de cel puţin cinci ori în cursul unei sarcini, renina şi aldosterona ca elemente de *screening* în hipertensiunea arterială, alfa-fetoproteina în sîngele matern şi în lichidul amniotic, pentru detectarea prenatală a spinei *bifida* şi a anencefaliei, TSH şi T_4 pentru depistarea hipotiroidiei nou-născutului etc. (42).

Metodele de automatizare cu flux continuu, folosite în chimia clinică pentru procedurile colorimetrice, sînt aplicabile în principiu şi metodelor cu radioliganzi, deşi există multe impedimente. Dificultăţile principale sînt generate de faptul că sistemele RIA, din punctul de vedere al realizării echilibrului de reacţie, sînt de mai multe tipuri: „la echilibru", „neechilibrate" sau „cvasiechilibrate".

Insuficient rezolvată este problema automatizării sistemelor RIA pentru hormonii steroizi, probele biologice necesitînd operaţii de preextracţie (43).

Organizarea efectuării analizelor în instalaţii automatizate prevede o intrare a datelor, prelucrarea lor la calculator şi o ieşire cu rezultatele şi analiza statistică a sistemului. Datele de intrare se referă la tipul de dozare, scopul (determinarea concentraţiei unei substanţe), diluentul, antiserul, marcatul, separarea etc. (44, 45). Protocolul programat asigură baza organizatorică a efectuării analizei în cursul întregului proces, de la intrarea probelor în aparat pînă la ieşirea rezultatelor. Rezultatele sînt înscrise clar sub forma unor buletine, iar informaţiile relevante sînt stocate în calculator.

Sistemele de analiză complet automatizate nu sînt accesibile decît centrelor mari, unde sînt într-adevăr utile. Totuşi, avalanşa de cereri pentru RIA impune unele măsuri de automatizare şi în laboratoarele mai mici, de aceea organizarea efectuării analizelor prevede automatizări parţiale, care privesc numai unele faze ale procesului de lucru (tabelul I.6.6).

Scanned with OKEN Scanner

Beneficiile sistemelor automatizate nu sînt neglijabile. Exceptînd reducerea mîinii de lucru şi a gradului de calificare, sporul principal constă în creşterea preciziei care este sub 3% (46), faţă de 10—20% în determinările

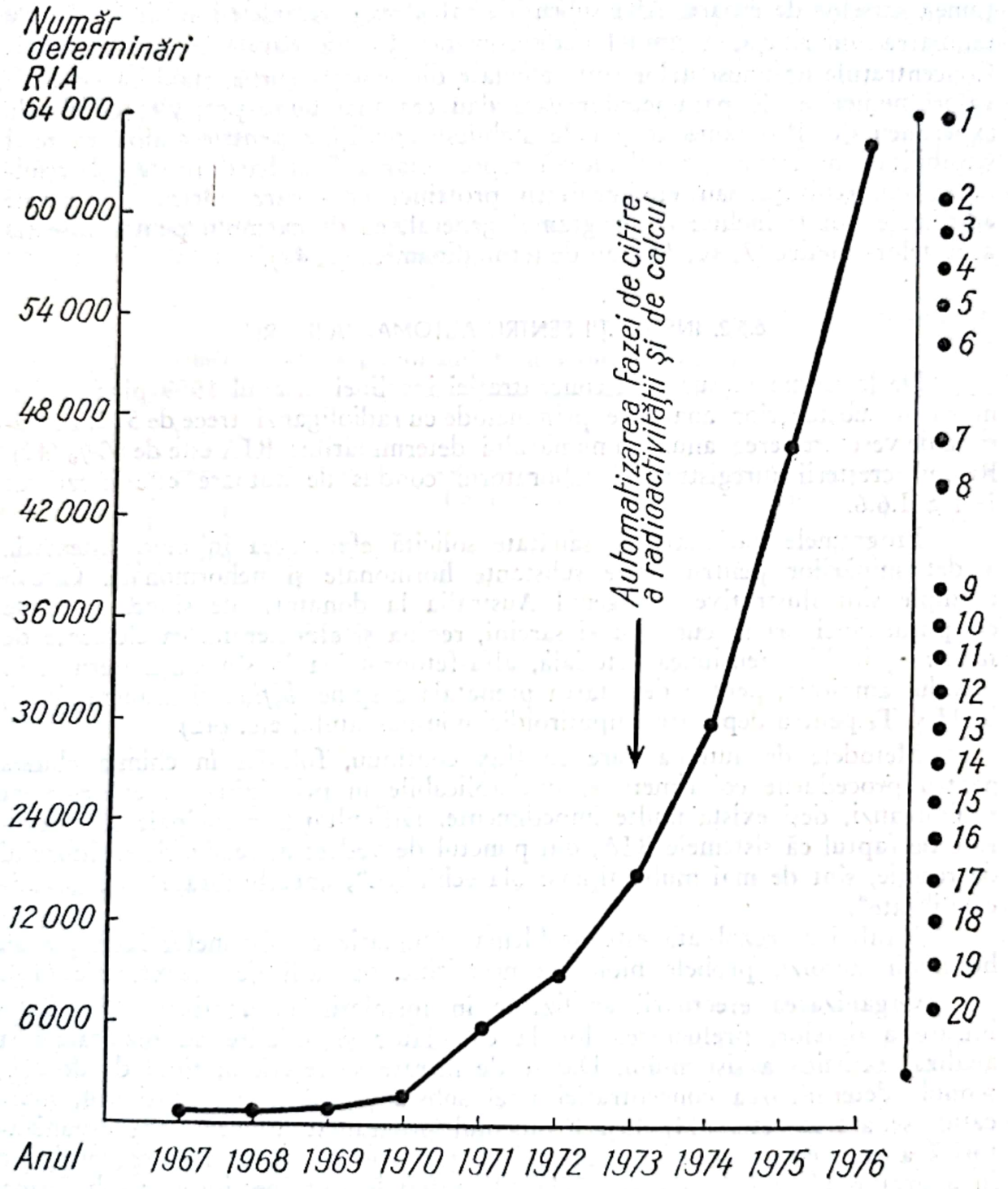


Fig. I.6.6. Determinări RIA în Laboratorul de radioimunologie al Institutului de endocrinologie. Substanţa analizată:

1 — Tiroglobulină (om) (trusă proprie); *2* — Angiotensina I (diferite specii); *3* — Prolactina (om); *4* — gonadotrofina corionică (om); *5* — Hormon luteinizant (animal); *6* — hormon foliculostimulant (animal); *7* — hormon corticotrop (om); *8* — adenozin monofosforic ciclic (diferite specii); *9* — prolactina (animal); *10* — testosterona (diferite specii); *11* — antigen Australia (om); *12* — gonadotrofină corionică—ß (om); *13* — hormon lactogen placentar (om); *14* — hormon luteostimulant (om); *15* — hormon foliculostimulant (om); *16* — hormon tireotrop (animal); *16* — hormon tireotrop (om); *18* — hormon de creştere (animal); *19* — insulina (om şi mamifere); *20* — hormon de creştere (om) (trusă proprie)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul I.6.6.

Modalităţi de efectuare a analizelor cu radioliganzi

Procedura	Modul de efectuare
Pipetare	manual cu micropipete parţial automat: cu dilutoare complet automat: la autoanalizor
Incubare	manual parţial automat: la autoanalizor discontinuu complet automat: la autoanalizor continuu
Separare	manual parţial automat: scoatere din autoanalizor complet automat
Citirea radioactivităţii	manual: la contor manual parţial automat: la contor cu pasor automat complet automat: la contor inclus în modulele autoanalizorului
Înscrierea curbelor	manual: grafic parţial automat: prin calcul la calculator electronic complet automat: la computer inclus în modulele autoanalizorului
Proiectarea unui nou sistem de analiză	experimental parţial automat: la computer complet automat: prin program inclus în memoria calculatorului din autoanalizor
Optimizarea sistemului de analiză	experimental şi intuitiv parţial automat: la calculator complet automat: prin program inclus în memoria calculatorului din autoanalizor

manuale. Numărul analizelor se ridică la o medie de peste 5 000 pe săptămînă pentru aproximativ 10 hormoni (8), faţă de 500 de determinări repartizate pe cel mult 5 hormoni cît se poate lucra într-un laborator cu tehnici manuale.

6.6. LABORATORUL RIA

Tehnologia radioimunologică implică pregătirea multidisciplinară: bio-, imuno- şi radiochimică, de hormonologie, de analiză statistică, de aceea dotarea laboratorului RIA cu personal calificat şi cu aparatură adecvată necesită estimarea judicioasă a posibilităţilor locale de realizare.

6.6.1. COMPETENŢA

Practic, din punctul de vedere al competenţei, distingem trei categorii de laboratoare: RIA cu truse comerciale, RIA cu prefabricate care implică proceduri de marcare şi RIA cu sisteme proprii.

Scanned with OKEN Scanner

Din punctul de vedere al responsabilităţilor, distingem laboratoare centrale şi laboratoare periferice, iar după localizare ele sînt urbane şi rurale (tabelul I.6.7).

Tabelul I.6.7.

Clasificarea laboratoarelor de analiză cu radioliganzi

Modul de clasificare	Categoria	Proceduri
A. Competenţă	lucrează cu: — truse producţie proprie ± sisteme creaţie proprie	— producţie reactivi, marcări, purificări, caracterizare, optimizare, validare şi control de calitate al sistemelor de dozare; — determinări cercetare ± rutină
	— prefabricate	— marcări, purificări, controlul de calitate al sistemelor de dozare, determinări de rutină ± cercetare
	— truse comerciale	— determinări de rutină
B. Responsabilitate	— centrale	— produc şi livrează reactivi şi seruri-test; — determinări de referinţă (control de calitate interlaboratoare); — instruire cadre; determinări cercetare + rutină
	— periferice	— determinări de rutină ± cercetare
C. Adresabilitate	— spitaliceşti	— determinări de rutină ± cercetare — producţie reactivi etc.
	— industriale	— determinări de rutină pentru produse biologice industrializate (insulină, HCG, ACTH, HGH); — antigen Australia la donatori şi în produse din sînge;
	— cercetare	— metodologia elaborării truselor, crearea a noi sisteme etc.
D. Localizare	— urbane	ca la A şi B
	— rurale (în ţări dezvoltate)	ca la A şi B

În general, laboratoarele RIA servesc spitale şi clinici, industria de medicamente şi cercetarea medico-biologică şi zootehnică.

Efectuarea analizelor hormonale cu ajutorul truselor comerciale este atît de simplă, încît aceste analize sînt efectuate deseori de către persoane necalificate, care necunoscînd sau neputînd înţelege capcanele acestor metode pot da rezultate greşite sau într-o interpretare neinformată, cu repercusiuni asupra sănătăţii populaţiei (14). De aceea, se recomandă instruirea cadrelor aproximativ 6—12 luni pentru tehnicile mai dificile, iar învăţămîntul să fie aplicat cu ajutorul unor manuale de referinţă bune (14, 15, 47).

Practic, s-a observat o mai bună eficienţă atunci cînd un operator execută o singură tehnică, deci migrarea de la o tehnică la alta ar trebui

Scanned with OKEN Scanner

limitată. Cînd acest deziderat nu este posibil, se foloseşte un singur „tip" de tehnică pentru mai multe sisteme RIA, ca de exemplu tehnica cu dublu anticorp, care este mai uşor de aplicat unui număr mare de sisteme şi este preluată mai rapid de la un operator la altul (15).

Durata învăţămîntului şi ritmul reciclărilor se aplică diferenţiat pentru personalul de conducere, de execuţie şi auxiliar, şi în funcţie de categoria de laborator, central sau periferic.

6.6.2. INTERDEPENDENŢA LABORATOARELOR

Dezvoltarea laboratoarelor pentru analize cu radioliganzi este dependentă de necesităţile (continue sau discontinue) naţionale, regionale sau locale.

Laboratoarele periferice, în ţările cu organizare la nivel naţional (Anglia) sînt dependente de laboratoarele centrale: un laborator central efectuează analize de referinţă pentru un număr de sisteme de analiză sau pentru un număr de laboratoare periferice şi, în plus, le pune la dispoziţie reactivi specifici.

La rîndul lor, laboratoarele centrale pot primi îndrumări metodologice de la un centru naţional orientat pe acelaşi profil de lucru.

Calibrarea standardelor naţionale şi a celor regionale şi locale faţă de standardele internaţionale este o altă latură a interdependenţei laboratoarelor de radioanaliză.

6.6.3. RANDAMENTUL LABORATOARELOR

În laboratoarele de biochimie, încă de peste un deceniu, aparatura automatizată a suscitat calculul rapidităţii (număr de analize per unitatea de timp), pe cînd în laboratoarele RIA, numai în ultimii 2—3 ani au putut fi realizate asemenea performanţe graţie evoluţiei sistemelor automate. Totuşi, numai în centrele mari ale ţărilor dezvoltate au intrat în practică linii de lucru complet automatizate.

În condiţii în care toate procedurile sînt efectuate manual, inclusiv măsurarea radioactivităţii, un laborator dotat cu un minimum de persoane calificate şi de aparatură poate efectua aproximativ 100—300 de determinări pe săptămînă, folosind numai truse comerciale (14).

Comparativ cu metodele biologice, metodele cu radioliganzi realizează un spor de randament echivalent cu 1—2 ordine de mărime.

6.6.4. ECONOMICITATEA

Costul unei determinări prin tehnici cu radioliganzi reprezintă o rezultantă a costului calificării, a mîinii de lucru, a reactivilor şi instrumentarului, a amortizării aparaturii etc. Pînă de curînd, preţul ridicat al aparaturii nucleare făcea ca această tehnologie să fie prohibitivă pentru multe instituţii spitaliceşti şi de cercetare. Astăzi însă, au fost realizate instrumente nucleare complet computerizate (48) al căror cost nu depăşeşte pe al unei centrifugi uzuale sau al unui alt aparat uzual dintr-un laborator de biochimie.

Pentru o mai bună gospodărire, experţii O.M.S. (14, 47) sugerează modele de organizare a laboratoarelor centrale şi periferice cu scheme ale etapelor necesare pentru înfiinţarea unui laborator.

Scanned with OKEN Scanner

O sursă de economii este prepararea reactivilor în cadrul laboratorului, cel puţin pentru analizele solicitate în număr mare. Este de reţinut că un singur iepure, care răspunde bine la imunizare, poate asigura cîteva milioane sau zeci de milioane de determinări, iar la o şarjă de marcare se poate obţine trasor pentru 5—10 000 analize (echivalînd cu porţia de trasor din 50—100 de truse comerciale).

Au fost elaborate protocoale pentru aprecierea metodelor cu radioizotopi inclusiv metodele RIA şi similare (49). Fişa de apreciere a unei noi metode în cadrul laboratorului care a elaborat-o include o serie de date:

— precizia intra- şi interserie;
— probe de liniarizare;
— analiza recuperării;
— randament;
— supraproducţie (eventual);
— cost;
— corelaţia cu diagnosticul clinic;
— sensibilitatea ş.a.

6.7. UNITĂŢI DE MĂSURĂ ŞI PRESCURTĂRI

În tabelul I.6.8. sînt prezentate prefixele unităţilor de măsură şi semnificaţia lor conformă cu sistemul standard internaţional, prescurtat SI (50).

Tabelul 1.6.8.

Prefixele S.I. (după referate, 50)

Factor	Prefix	Simbol pentru prefix	Factor	Prefix	Simbol pentru prefix
10^{18}	exa	E	10^{-1}	deci	d
10^{15}	peta	P	10^{-2}	centi	c
10^{12}	tera	T	10^{-3}	mili	m
10^{9}	giga	G	10^{-6}	micro	μ
10^{6}	mega	M	10^{-9}	nano	n
10^{3}	kilo	k	10^{-12}	pico	p
10^{2}	hecto	h	10^{-15}	femto	f
10^{1}	deca	ha	10^{-18}	atto	a

6.7.1. UNITĂŢI DE MĂSURĂ PENTRU GREUTATE

gram = g
decigram = dg = 10^{-1} g
centigram = cg = 10^{-2} g
miligram = mg = 10^{-3} g
microgram = μg sau ug = 10^{-6} g
nanogram = ng = 10^{-9} g
picogram = pg = 10^{-12} g
femtogram = fg = 10^{-15} g
attogram = ag = 10^{-18} g

Scanned with OKEN Scanner

6.7.2. UNITĂȚI DE MĂSURĂ PENTRU VOLUM

litru = l
decilitru = dl = 10^{-1} l
centimetru cub = mililitru = ml = 10^{-3} l
microlitru = l sau ul = 10^{-6} l = 10^{-3} ml

6.7.3. UNITĂȚI DE MĂSURĂ PENTRU CONCENTRAȚIE

mol = cantitatea de substanță exprimată în grame, numeric egală cu masa moleculară; submultipli: mmol, μmol, nmol, pmol etc.
molaritate = mol/l sau M = numărul de moli dintr-o substanță dizolvați în 1 000 g de dizolvant;
mili Molar = mM = 10^{-3} M
micro Molar = μM = 10^{-6} M
nano Molar = nM = 10^{-9} M
pico Molar = pM = 10^{-12} M

6.7.4. UNITĂȚI DE MĂSURĂ PENTRU RADIOACTIVITATE

Curie (Ci) și Becquerel (Bq)
1 Ci = 37 G Bq = 37 x10^9 Bq
1 mCi = 37 M Bq = 37 x10^6 Bq
1 μCi = 37 K Bq = 37 x10^3 Bq

6.7.5. EXPRIMAREA REZULTATELOR RIA ÎN SISTEM SI

În ultimii ani se încearcă unificarea modului de exprimare a rezultatelor (50) folosind, pentru hormoni dar și pentru alte substanțe cantificate în cadrul biochimiei clinice, unitățile de măsură pentru concentrație raportate la litru.

Cîteva exemple sînt prezentate în tabelul I.6.9.

Tabelul I.6.9.

Exprimarea rezultatelor RIA în sistem SI

Substanța	Unitatea „veche"	Factor de conversie vechi→nou	Unitatea „nouă"	Factor de conversie nou→vechi
Androsterona	μg/dl	34,43	nmol/l	0,02904
ACTH	pg/ml	0,2202	pmpl/l	4,541
Cortisol	μg/dl	0,02759	μmol/l	36,25
Glucoza	mg/dl	0,05551	mmol/l	0,1802
Insulina	μU/ml	7,175	pmol/l	0,1394
Progesterona	μg/l	3,180	nmol/l	0,3145
Tiroxina (T_4)	μg/dl	12,9	nmol/l	

Exemplu numeric
Androsterona are GM = 290,445
1 μg × 34,43 = 34,43 nmol/l
1 nmol = 290,445 ng
34,43 nmoli × 290,445 ng = 10 000 ng/l = 10ug/l = 1ug/dl
34,43 nmoli/1x0,02904 = 0,99984ug/dl≃1ug/dl

Scanned with OKEN Scanner

Hipofiza

HGH = hormon de creştere uman. Sinonime = human growth hormone (HGH), somatotropic hormone (STH)

TSH = hormon tireostimulant (Thyroid stimulating hormone)

LH = hLH = hormon luteinizant uman (human luteinzing hormone)

FSH = hFS = hormon foliculostimulant uman (human follicle stimulating hormone).

ACTH = hormon adrenocorticotrop (adrenocorticotropin hormone) sau hormon corticotrop

Prl = Prolactina

MSH = hormonul melano (sau melanocito) stimulator (melanostimulating hormone)

Oxi = Oxitocina sau ocitocina

VP = vasopresina

AVP = arginin-vasopresina

LVP = lizin-vasopresina

Hipotalamus

RF = RH = factor de eliberare sau hormon de eliberare (releasing factor sau releasing hormone); se mai numesc şi liberine.

TRH = TRF = hormon sau factor de eliberare al TSH (thyreotrop releasing hormone)

Gn RH = Gn RF = LH/FSH-RF = LH/FSH-RH = factor de eliberare al gonadotrofinelor

CRF = factor de eliberare al corticotropului

SRIF = GIF = factor de inhibiţie a eliberării somatotropului = somatostatina

PIF = factor de inhibiţie a eliberării prolactinei

Tiroida

Tgl = tiroglobulina

TCT = CT = tirocalcitonina sau calcitonina

T_3 = triiodotironina

T_4 = tiroxina

LATS = stimulator de durată al tiroidei (long acting thyroid stimulator); activitatea LATS este detectabilă în fracţiunea gamaglobulinică din serul pacienţilor cu anumite tireopatii.

Paratiroida

Pth = parathormonul sau hormonul paratiroidian

Gonade

T = testosterona

E = estrogeni

P = progesterona

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. **Walker W. H. C., Keane P. M.** — In: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 1977, p. 87.
2. **Berson S. A., Yalow R. S.** — J. Clin. Invest., 1959, *38*, 1 966.
3. **Karush F.** — Adv. Immunol., 1962, *2*, 1.
4. **Rodbard D., Bridson W., Rayford P. L.** — J. Lab. clin. Med., 1969, *74*, 770.
5. **Weaver C. K., Cargille C. M.** — J. Lab. clin. Med., 1971, *77*, 661.
6. **Malan P. G., Newman G. B., Ekins R. P.** — Acta Endocrinol. (Suppl. 177), 1973, 99.
7. **Ekins R. P.** In: „Radioimmunoassay and related procedures in medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 1, p. 91.
8. **Marschner I., Erhardt F., Scriba P. C.** — In: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 1, p. 111.
9. **Rodbard D., Munson P., De Leaw A.** — In: „International Symposium on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine" Berlin, 31. X. —4. XI. 1977.
10. **Ekins R. P., Newman G. B., O'Riordan J. L. H.** — In: „Radioisotopes in Medicine: in vitro Studies" (editat de R. L. Hayes, F. A. Goswitz, B. E. P. Murphy), U.S. Atomic Energy Commission, Oak Ridge, Tennessee, 1968, p. 59.
11. **Midgley A. R., Niswender G. D., Rebar R. W.** — Acta endocrinol. Suppl. 142, 1969, 163.
12. **Rodbard D.** — In: „Competitive Protein Binding Assays" (editat de W. D. Odell şi W. H. Daughaday), Lippincott, Philadelphia, 1971, p. 204.
13. **Abraham G. E.** — Acta Endocrinol. (Suppl. 183), 1974, *75*, 1.
14. * * * — WHO Expert Committee on Biological Standardization, Technical Report Series 565, WHO, Geneva, 1975.
15. **Munkner T.** — In: „IAEA Research Co-ordination Meeting on in vitro procedures and techniques", Londra, 29. XI—3. XII. 1976.
16. * * * — Standardization on Radioimmunoassay procedures, Internat. J. Appl. Rad. Isot., 1974, *25*, 145.
17. **Simionescu L.** — In: „Compuşi marcaţi şi radiofarmaceutici cu aplicaţii în medicină" (A. Balaban, I. Gălăţeanu, L. Simionescu), Ed. Acad. R.S.R., 1979.
18. **Shewhart W. A.** — „Economic control of quality of manufacturing products", MacMillan & Co Ltd., Londra, 1951.
19. * * * — National Institute for Biological Standards and Control, Notes on Biological Standards, Londra, 1976.
20. * * * — Expert Panel on Nomenclature and Principles of Quality Control in Clinical Chemistry, Provisional Recommendation on Quality Control in Clinical Chemistry, Clin. chim. Acta., 1975, *63*, F 25.
21. * * * — IAEA Symposium on „In vitro procedures with radioisotopes in Medicine", Viena, 1969.
22. * * * — IAEA Symposium on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Istanbul, 1973.
23. * * * — IAEA Symposium on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin, 1977.
24. **Malvano V., Zucchelli G. C., Quesada T., Gandolfi C., Piro M. A.** — J. Nucl. Biol. Med., 1974, *18*, 80.
25. **Constantini A., Lostia O., Malvano R., Rolleri E., Taggi F., Zucchelli G. C.** — J. Nucl. Biol. Med., 1975, *19*, 322—1.
26. **Malvano R., Quesada T., Rolleri E., Gandolfi C., Zucchelli G. C.** — Clin. chim. Acta., 1974, *51*, 127.
27. **Garcia E. J., Saracci R.** — In: „IAEA Panel on Standardization of RIA Procedures", Viena, 1972.
28. **Tonks D. B.** — Can. J. Med. Techn., 1968, 30, 38.
29. **Healy M. J. R., Mitchell F. L.** — In: „Clinical Biochemistry — Principles and Methods" (editat de H. Ch. Curtius şi M. Roth), Gruyter & Co. Walter De, J. Guttentag, Georg Reimer, Karl J. Trübner, Veit & Co., Berlin, 1974, vol. 1, p. 594.
30. **Goldsmith P. L., Woodward R. A.** — „Cumulative Sum Techniques", Oliver and Boyd, Edinburgh, 1964.
31. **Bissell A. F.** — Appl. Statist., 1969, 18, 1.
32. **Marschner I., Herndl R.** — In: „IAEA, Research Co-ordination meeting in vitro procedures and techniques", Londra, 29. XI—3. XII. 1976.

Scanned with OKEN Scanner

33. **Bizollon Ch. A., Cohen R., Froget D.** — In: „IAEA Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31. X.—5. XI. 1977.
34. **Breuer H., Jungbluth D., Marschner I., Röhle G., Scriba P. C., Wood W. G.** — In: IAEA Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31. X.—4. XI. 1977.
35. **Cresswell M. A., Hall P. E., Hurn B. A. L.** — In: IAEA Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procesures in Medicine", Berlin (vest), 31. X.—4. XI. 1977.
36. **Wood W. G., Marschner I., Scriba P. C.** — In: IAEA Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31. X.—4. XI. 1977.
37. **Yalow R. S.** — Circulat. Res. (Suppl. 1), 1973, I, 116.
38. **Ekins R. P., Newman G. B.** — In: „Protein and Polypeptide Hormones" (editat de M. Margoulies), Excerpta med. (Amst.) Sect. III, 1969, p. 329.
39. **Scatchard G.** — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1949, *51*, 660.
40. **Rodbard D., Rayford P. L., Cooper J., Ross G. T.** — J. clin. Endocr., 1968, *129*, 352.
41. **Berson S. A., Yalow R. S.** — The Hormones, 1964, *4*, 567.
42. **Krane P. M., Walker N. H. C., Gauldie J., Abraham G. E.** — Clin. Chem., 1976, *22*, 70.
43. **Kuss G.** — In: IAEA Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and related procedures in Medicine", Berlin (vest), 31. XI.—4. XI. 1977.
44. **Rodbard D., Lewald J. E.** — Acta Endocrinol., 1970, *64*, 79.
45. **Duddlesen W. G., Midgley A. R. jr., Niswender G. D.** — Computer and Biomedical Research., 1972, *5*, 205.
46. **Forrest G. C., Anderson M., Jay R. F., Landon J.** — In: „IAEA Research Co-ordination Meeting on in vitro procedures and techniques", Londra 29. XI—3.XII, 1976.
47. * * * — „Radioimmunoassay of hormones for clinical trials of fertility regulating agents in developing countries", Technical Report Series, 578, WHO, Geneva, 1975.
48. **Dudley R. A., Figdor H. C., Morris A. C. jr., Mutz C. J.** — In: IAEA Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31. X.—4. XI. 1977.
49. * * * — A suggested protocol for evaluation of isotopic tests, Nuclear Medical Laboratories Inc., Dallas, Texas, S.U.A.
50. * * * — The SI for the health professions, W.H.O., Geneve, 1977.

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA SPECIALĂ

INTRODUCERE

Parcurgînd materialul referitor la cantificarea substanţelor hormonale şi nehormonale cu ajutorul sistemelor RIA, am putut constata că nici una din clasificări nu este satisfăcătoare.

O clasificare utilă practicienilor ar putea fi cea bazată pe categorii de substanţe cu interes pentru o anumită specialitate. O astfel de împărţire duce la suprapuneri între domenii, de exemplu substanţe ca HCG, ACTH, HGH sînt utile oncologului, dar şi ginecologului şi endocrinologului.

O altă clasificare ar putea fi cea bazată pe sisteme de substanţe implicate într-un anumit proces fiziologic, cum este sistemul renină-angiotensină-aldosteronă, dar în afară de acesta nu am detectat alte sisteme bine conturate. De exemplu sistemul hormonilor cu implicaţii în metabolismul calciului (calcitonina, parathormonul) nu acţionează izolat, ci în legătură şi cu hormonii tiroidieni, care aparţin mai degrabă sistemului hipotalamus-hipofiză-tiroidă.

Împărţirea în hormonii peptidici şi steroizi creează surse de repetare a interpretării rezultatelor; de exemplu pentru a interpreta rezultatul cortizolului (steroid) plasmatic este necesar să se ţină seamă de concentraţia ACTH (polipeptid) şi invers.

În plus, categoria iodotironinelor (T_3 T_4) şi a iodotirozinelor DIT nu aparţine polipeptidelor.

De aceea, am recurs la o împărţire pe capitole după criterii variabile: localizare (hormonii hipotalamici, hipofizari, tiroidieni), fiziopatologie (sistemul renină-angiotensină-aldosteronă), domeniu de utilizare (proteinele fetoplacentare şi ectohormonii) etc.

Scanned with OKEN Scanner

Este posibil ca rezultatele acumulate pe viitor, cu ajutorul metodelor RIA și înrudite, să permită clasificări pe baze fiziopatologice, astăzi abia schițate sau deloc cunoscute. Mă refer în acest sens la captarea unei varietăți de substanțe biologic active, aparent fără vreo legătură fiziologică, la unul și același receptor (Simionescu L., în: „Compuși marcați și radiofarmaceutici în medicină", partea a III-a, 1979).

Scanned with OKEN Scanner

1

PEPTIDE CEREBRALE

1.1. HORMONI HIPOFIZOTROPI

Consideraţii generale. Descoperirea hormonilor hipotalamici cu rol în reglarea sintezei şi eliberării hormonilor hipofizei anterioare este rezultatul cercetărilor desfăşurate pe o perioadă de 30 de ani (1930—1960) (1). Studiul relaţiilor dintre hipotalamus şi hipofiză este urmarea descoperirii legăturilor vasculare prin sistemul port hipotalamo-hipofizar (2).

Ipoteza reglării neuroumorale a secreţiei hipofizei a început cu gonadotrofinele. Propusă prima oară de Harris în 1937 (1), ipoteza sa a fost susţinută de experienţe de stimulare electrică a hipotalamusului, de întrerupere a vaselor sanguine dintre hipofiză şi hipotalamus prin secţionarea tijei şi prin transplante heterotope de hipofiză. Ulterior, implicaţiile sistemului nervos central în procesul secreţiei gonadotrofinelor au fost demonstrate prin stimularea şi inhibiţia farmacologică a gonadotrofinelor cu ajutorul substanţelor cu acţiune centrală, prin inhibiţia hipofizei cu implante intrahipotalamice de hormoni steroizi şi prin înregistrarea activităţii bioelectrice a creierului asociată cu stimularea hipofizei (3).

Controlul funcţiei hipofizei anterioare este sub dependenţa secreţiei diferitelor formaţiuni ale hipotalamusului (fig. II.1.1). Sînt postulaţi nouă factori hipotalamici hipofizotropi (fig. II.1.2), dar numai trei sînt bine caracterizaţi. Procesul reglării hipotalamus-hipofiză-glandă ţintă-ţesut periferic este conceput astăzi ca un sistem de reglare cu *feedback*-uri pozitive şi negative (fig. II.1.3).

Pentru desemnarea produşilor neurosecreţiei, termenul de *releasing factors* sau *releasing hormones* este cel mai răspîndit (7). Alţi termeni generali ca hormoni (factori) hipofizotropi sau liberine, respectiv inhibine, sînt de asemenea utilizaţi în unele lucrări. Pentru un anumit hormon hipofizotrop sînt folosiţi termeni ca: tireoliberină, gonadoliberine şi somatoinhibină, după cum au acţiune de eliberare (*releasing*) sau de inhibiţie a eliberării.

Scanned with OKEN Scanner

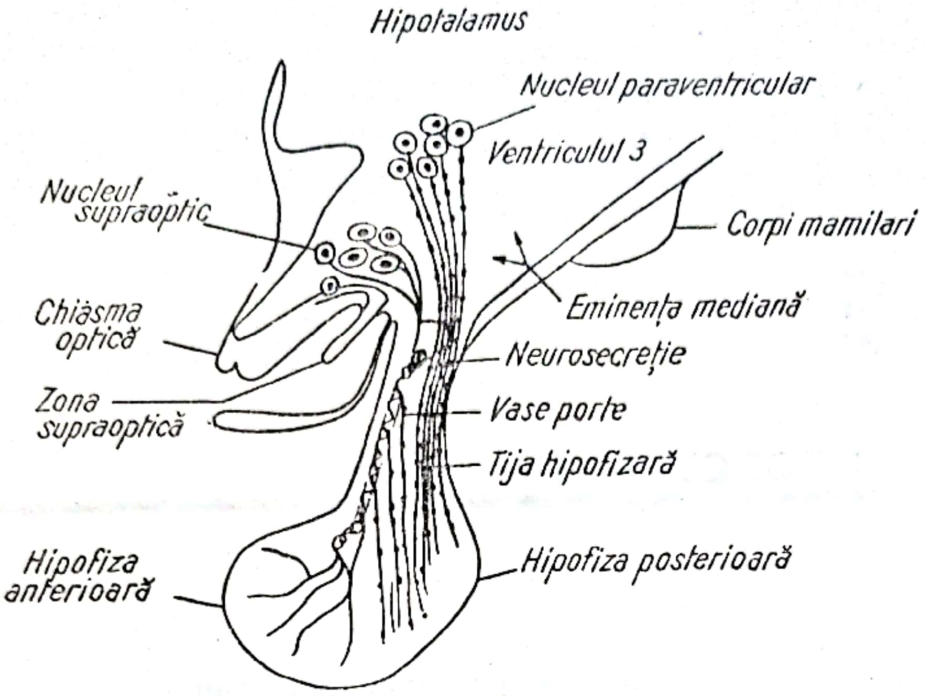


Fig. II.1.1. Zona hipofizotropă a hipotalamusului și relația cu hipofiza (4).

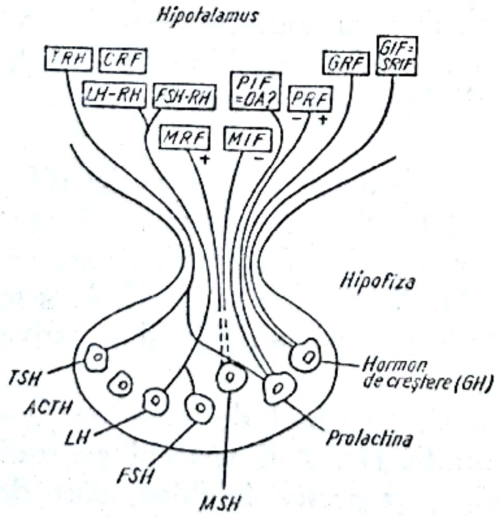


Fig. II.1.2. Relația dintre hormonii hipofizotropi și cei hipofizari.

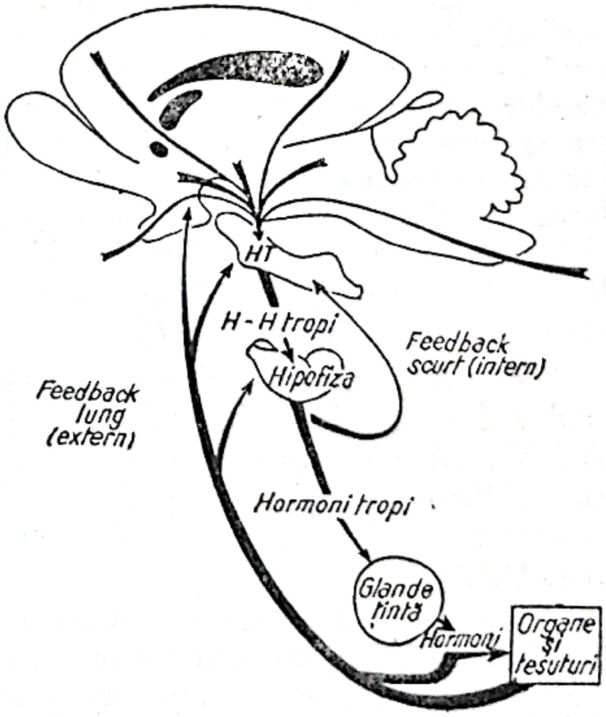


Fig. II.1.3. Reprezentarea schematică a controlului funcției hipofizei anterioare (5, 6); HT=hipotalamus; H-Htrop = hormoni hipofizotropi.

Scanned with OKEN Scanner

Cercetările privind prezența, activitatea fiziologică, determinarea structurii chimice și sinteza organică a acestor liberine au primit, prin acordarea premiului Nobel pe anul 1977, recunoașterea internațională.

Metode de radioimunoanaliză au fost dezvoltate pentru gonadoliberine, tireoliberină și somatoinhibină.

1.1.1. RIA-GONADOLIBERINELOR

a) *Introducere.* Activitatea gonadoliberinei (sinonim *releasing* hormon de gonadotrop, prescurtat Gn-RH, LH/FSH-RF, LRF sau LH-RH) a fost demonstrată prima oară în anul 1960 (8). Inițial s-a crezut că activitatea LH-RH și FSH-RH reprezintă proprietățile a două substanțe diferite, dar cercetările cu preparate foarte purificate au arătat că una și aceeași moleculă stimulează și LH și FSH. Structura chimică și sinteza au fost realizate în următoarea decadă (9, 10) (fig. II.1.4).

LH/FSH-RF este un decapeptid cu GM de aproximativ 1 300 și T $^1/_2$ de 6—7 minute.

Măsurarea prin RIA este o realizare de dată relativ recentă (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18).

b) *RIA*

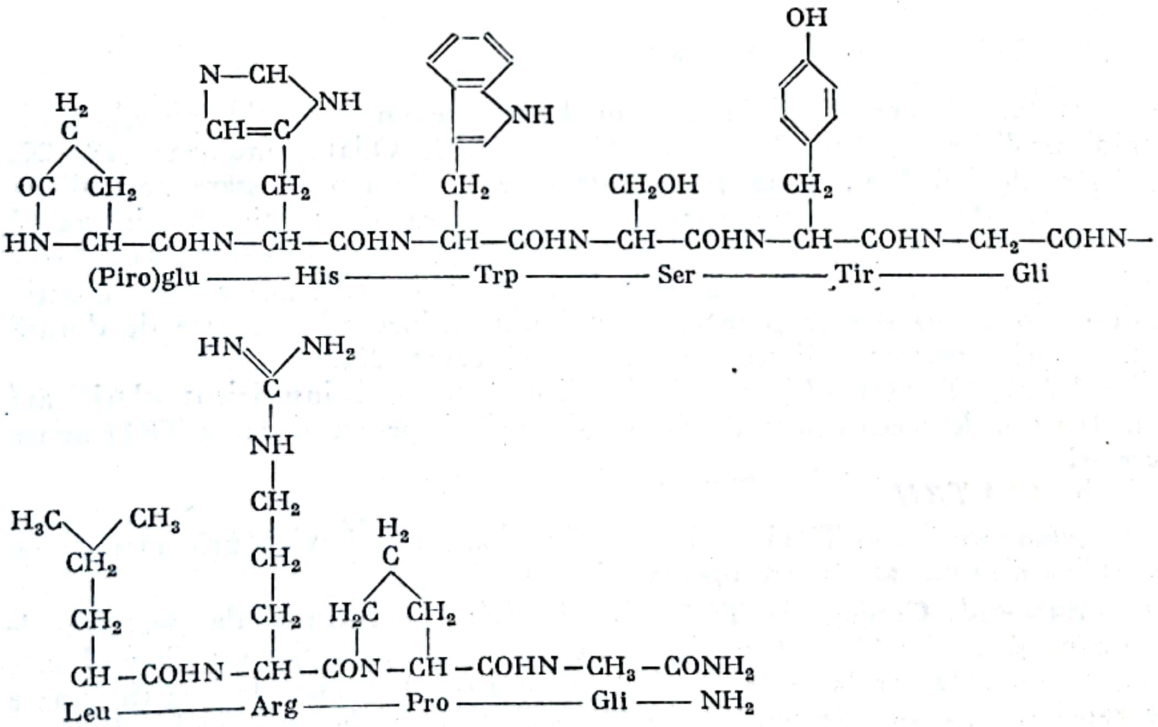


Fig. II.1.4. Structura moleculară a LH/FSH-RH (11).

Imunogenul este un conjugat de LH/FSH-RH sintetic cu albumină, conjugarea are loc la grupările hidroxil ale serinei sau tirozinei (17). Absorbția preparatelor de LH/FSH-RF pe polivinil-pirolidon a fost utilizată cu succes (14).

Scanned with OKEN Scanner

Antiserul obţinut la iepuri sau cobai are titrul relativ redus de exemplu 1:8 000 (17).

Trasorul ^{125}I-LH/FSH-RF se obţine prin metoda de marcare cu cloramină-T şi purificare pe Sephadex G-15 (17).

Probele de ser sau de urină sînt supuse în prealabil extracţiei cu 3 volume de metanol (14). Şi preparatele de hipotalamus sau de LCR sînt supuse extracţiei.

Sensibilitate: 50—150 pg/ml în funcţie de calităţile antiserului (14, 15), cu preincubare.

Validarea sistemului RIA se obţine injectînd LH/FSH-RF cu urmărirea creşterii nivelului plasmatic.

c) *Rezultate şi aplicaţii*

Nivelul seric al LH/FSH-RH este de 10—20 pg/ml. După administrarea i.v. a 100µg de LH/FSH-RH apare un maximum de 5—10 ng/ml la 2—5 minute; aproximativ 1—2% se excretă în urină primele 8 ore şi din acest procent jumătate se excretă în prima oră după injecţie.

Excreţia în urină a gonadoliberinei este mai redusă la copii (4,2 ng/24 ore) decît la adulţi (7,9 ng/24 ore) (18).

După stimularea cu noradrenalină, L-dopa şi clomifen citrat nu s-a putut detecta gonadoliberină în extracte de plasmă (18).

Au fost observate creşteri multiplicative şi cu un ordin de mărime la mijlocul ciclului menstrual la femei normale (15).

Aplicaţiile clinice au deocamdată un interes strict teoretic.

1.1.2. RIA-TIREOLIBERINEI

a) *Introducere.* Tireoliberina sau TRH este un tripeptid, piroglutamil-histidil-prolinamidă (fig. II.1.5) cu GM = 500. Odată sintetizat (19, 20, 21), efectele TRH au putut fi studiate extensiv la om în stare normală şi patologică. Principala acţiune a TRH este aceea de a stimula sinteza şi eliberarea TSH la om şi la animal (22, 23) şi a prolactinei la om (24). Observaţia că poate influenţa favorabil unele stări psihice (25, 26) a atras atenţia multor cercetători dar se pare că efectul său antidepresiv nu este de durată sau, în unele experienţe clinice nu a putut fi observat (27).

Relaţia TRH-TSH-hormoni tiroidieni este încă insuficient clarificată (fig. II.1.6.), de aceea o metodă simplă şi sensibilă pentru dozarea TRH apare necesară.

b) *RIA-TRH*

Imunogenul este TRH cuplat cu albumină serică bovină prin metoda cu benzidină diazotizată (26), recuperat prin dializă.

Antiserul. Conjugatul TRH-albumină cu concentraţia de proteină de 1 mg/ml şi de TRH 37,3 µg/ml omogenizat v/v cu adjuvant Freund este inoculat intraplantar la iepure în volum de 1,6 ml, urmat de injecţii lunare de rapel. La 7—14 zile după fiecare inoculare se prelevează probe de sînge pentru testare (29, 30, 31).

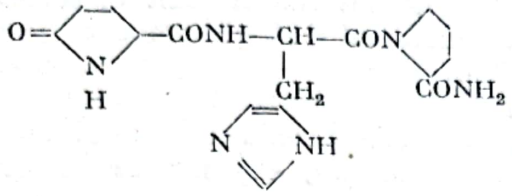
Trasorul. ^{125}I-TRH se obţine prin metoda cu cloramină-T pornind cu 10 µg TRH sintetic şi 1 mCi ^{125}I, urmată de purificare şi repurificare pe coloană de Sephadex G-10 (17, 29, 30, 31).

Probele biologice. Plasma şi urina sînt supuse extracţiei după metoda folosită pentru RIA-Gn-RH.

Scanned with OKEN Scanner

Separarea complexelor legate se poate face prin tehnicile uzuale; s-a folosit de exemplu tehnica cu dublu anticorp (29).

Sensibilitate. A putut fi detectată o concentraţie de 0,1 ng/ml (17, 29, 32, 33).



L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamidă

Fig. II.1.5. Formula structurală a TRH.

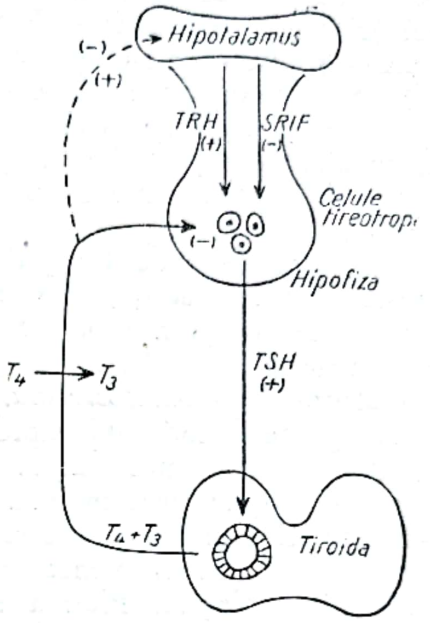


Fig. II.1.6. Reprezentare schematică a relaţiei hipotalamus-hipofiză-tiroidă (28). SRIF = somatotrop releasing inhibiting factor; (+) = stimulare; (—) = inhibiţie; $T_3 \rightarrow T_4$ = conversiunea periferică; → = cale ipotetică.

Specificitate. Analogi de sinteză ai TRH inhibă reacţia ^{125}I-TRH cu anticorpul numai la concentraţii cu 2—4 ordine de mărime mai mari (26).

c) *Rezultate şi aplicaţii*

TRH este distrus rapid în prezenţa serului *in vitro* (17, 29, 30, 31). În amestecul de reacţie rămîne stabil aproximativ o oră apoi este distrus de enzime chiar în prezenţa unui inhibitor enzimatic de tip Trasylol (17). Totuşi, alţi inhibitori enzimatici ca benzonidina sau BAL (dimercaptopropanol) pot preveni degradarea cu condiţia să fie folosiţi încă din momentul prelevării în seringa de colectare (17, 30, 31).

Ca şi RIA—Gn—RH, măsurarea TRH în lichidele biologice prezintă, deocamdată, un interes mai mult teoretic.

1.1.3. RADIOIMUNOANALIZA SOMATOSTATINEI

a) *Introducere.* Al treilea hormon regulator al hipotalamusului a fost identificat chimic în 1973 (34). Este un tetradecapeptid ciclic (fig. II.1.7.). Acest peptid reglează secreţia şi eliberarea hormonului de creştere prin inhi-

H—Ala—Gli—Cis—Lis—Asn—Phe—Phe—Trp—Lis—Tr—Phe—Tr—Ser—Cis

Fig. II.1.7. Structura chimică a somatostatinei.

biţie tonică şi de aceea a fost numit somatostatină, GH—RIH, GH—IF sau GIF (*growth hormone release inhibiting hormone* sau *factor*). Efectele sale se extind şi asupra hormonilor pancreatici, determinînd supresia insulinei şi a glucagonului dar şi a altor hormoni gastrointestinali ca gastrina şi colecis-

Scanned with OKEN Scanner

tochinina (35). Somatostatina este o substanţă cu localizare ubicuitară: hipotalamus şi alte zone ale creierului, tractul intestinal, pancreas şi tiroidă.

Preparatele obţinute pe calea sintezei organice sînt la fel de active ca şi somatostatina naturală (34, 36, 37, 38). Rolul fiziologic, implicaţiile în patologie şi efectele farmacologice ale somatostatinei sînt obiect de cercetare. În acest scop a fost dezvoltată metoda RIA pentru cantificarea sa în lichidele şi ţesuturile biologice (39, 40, 41).

b) *Radioimunoanaliza somatostatinei*

Imunogenul. Preparatele de somatostatină conjugată cu alfaglobulină serică umană prin metoda cu glutaraldehidă (39, 40) sau cu hemocianină prin metoda de condensare cu carbodiimidă (36) servesc pentru obţinerea antiserului.

Antiserul. Doze de 4 mg de somatostatină-globulină (39, 40) sau 1 mg somatostatină-hemocianină, omogenizate în adjuvant Freund şi injectate repetat la iepuri au permis obţinerea antiserului adecvat pentru RIA. Au fost obţinute titruri RIA de 1 : 25 000 (diluţie iniţială) (41).

Trasorul ^{125}I-*Somatostatina.* Din molecula somatostatinei lipseşte tirozina, care poate fi iodurată rapid. De aceea se folosesc pentru iodurare preparate de tirozină-somatostatină obţinute prin sinteză în fază solidă (32). Iodurarea se obţine prin metoda cu lactoperoxidază (39, 40) sau cu cloramină-T (36). Din amestecul de reacţie se obţine ^{125}I-Somatostatina prin purificare pe coloană de carboximetilceluloză (CMC).

Probele biologice. Plasma este supusă extracţiei cu acetonă (39, 40) sau separarea prin cromatografie. LCR şi urina sînt folosite fără preextracţie. Dozarea somatostatinei în hipotalamus se face în supernatantul obţinut prin extracţie în acid acetic 2N şi centrifugare, diluat în tamponul de lucru la concentraţia dorită.

Condiţii de incubare. În cursul incubărilor în prezenţa lichidelor biologice, somatostatina nu suferă modificări.

Tehnica de separare este adsorbţia pe particule de cărbune-dextran.

Specificitate: O varietate de polipeptide de extracţie şi de sinteză ca *releasing*-factori, hormoni retro- şi antehipofizari testaţi în sistem RIA nu au interferat reacţia dintre antiser şi ^{125}I-Somatostatină (39, 40, 31).

Sensibilitate. Sistemul RIA detectează concentraţii de 0,1 ng/ml.

b) *Rezultate şi aplicaţii*

LCR la 24 persoane normale: au fost observate concentraţii de 55 ± 5 pg/ml (media $\pm$ eroarea standard); curba diluţiilor seriate a fost paralelă cu curba standard (41).

Urină la 3 persoane normale: $5{,}1 \pm 12$ pg/mg creatină (41).

Extracte de ser de la 10 persoane normale: concentraţia observată a fost de 327 ± 33 pg/ml.

Domeniul de aplicaţii se limitează în prezent la localizarea somatostatinei în diferite ţesuturi şi la detectarea formelor heterogene tisulare şi circulante (41).

1.1.4. RADIOIMUNOANALIZA ENCEFALINELOR

a) *Introducere*

Au fost descoperite substanţe capabile să intre în competiţie cu opiaceele pentru *situs*-urile receptoare cerebrale specifice morfinei (42). Aceste substanţe

Scanned with OKEN Scanner

morfinomimetice, numite endorfine, ar putea fi precursori ai unor molecule mai mici — encefalinele —, pentru care se postulează rolul de neurotransmiţători ai efectului analgezic (43).

Cunoaşterea repartiţiei lor intracerebrale şi a variaţiilor lor în cursul stărilor psihopatologice necesită o metodă rapidă, specifică şi sensibilă de măsurare. Recent (44, 46) a fost pusă la punct metoda RIA pentru dozarea encefalinelor.

Sînt cunoscute două encefaline (38), care sînt pentapeptide cu structura H—Tir—Gli—Phe—Met—OH (prescurtat Met—Enc) şi H—Tir—Gli—Gli—Phe—Leu—OH (prescurtat Leu—Enc). Ambele encefaline au fost obţinute prin sinteză organică (45).

b) *Radioimunoanaliza encefalinelor*

Imunogenele: Met—Enc şi Leu—Enc sînt cuplate cu ovalbumină prin metoda cu carbodiimidă urmărită cu encefalină tritiată. Purificarea se face prin dializă.

Antiserul se obţine prin imunizare cu cîte 1 mg de imunogen în adjuvant Freund. După 3 injecţii de rapel au fost obţinuţi anticorpi la titru convenabil (44).

Marcarea cu ^{125}I *— Met—Enc* este marcată prin metoda de iodurare enzimatică cu lactoperoxidază, iar Leu— Enc prin metoda cu Cloramină-T.

Tehnica de separare folosită a fost precipitarea imunoglobulinelor cu polietilenglicol (PEG).

Produsele biologice. Tehnica RIA este folosită pentru cantificarea encefalinelor în ţesutul cerebral. Se foloseşte o tehnică de extracţie în HCl 0,1 N la 0°C, urmată de precipitarea proteinelor din omogenat prin încălzire la 95°C timp de 15 minute şi centrifugare 5 minute 9800 g. Supranatantul este colectat şi adus la pH=7,4 cu tampon Tris 0,1 M şi apă distilată (44).

Specificitate. O serie de analogi ai encefalinelor testaţi cu serurile anti-Met—Enc şi anti-Leu—Enc nu dau reacţii încrucişate în sistemul RIA. Serul anti-Met—Enc reacţionează în proporţie de numai 5% cu Leu—Enc, iar serul anti-Leu—Enc 7% cu Met—Enc (44).

Sensibilitatea celor două sisteme RIA este de aproximativ 1 picomol/ml.

c) *Rezultate şi aplicaţii*

Concentraţia maximă a Met—Enc şi a Leu—Enc a fost observată în striat şi în hipotalamus, iar concentraţia minimă este în mezencefal (44).

Domeniul de aplicaţie al radioimunoanalizei encefalinelor este o problemă a viitorului.

Observaţii privind implicaţiile fiziopatologice ale acestor substanţe sînt prezentate în volumul „Endorfinele" (47).

BIBLIOGRAFIE

1. **Harris C. W.** — „Neural Control of the Pituitary Gland", Monograph of the Physiol. Soc. Arnold, Londra, 1955.
2. **Popa Gr. T., Fielding V.** — J. Anat., 1930, *65*, 88.
3. **Sawyer F. H.** — Pharmacol. Rev., 1961, *13*, 225.
4. **Hansel W.** — Int. J. Fertil., 1961, *6*, 241.
5. **Halász B.** — J. Neuro-visceral Relations, 1969, *9*, 329.
6. **Szentágothai J. B., Flerkó B., Mess B., Halász B.** — Hypothalamic control of the anterior pituitary, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1962.
7. **Saffran M., Schallay A. V.** — Can. J. Biochem., 1955, *33*, 408.

Scanned with OKEN Scanner

8. **McCann S. M., Taleisnik S., Friedman H. M.** — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, *104*, 432.
9. **Schally A. V., Arimura A., Baba Y., Nair R. M. G., Matsuo H., Redding T. W., Debeljuk L., White W. F.** — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, *43*, 393.
10. **Matsuo H., Arimura A., Nair R. M. G., Schally A. V.** — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, *45*, 822.
11. **Schally A. V., Arimura A., Kastin A. J.** — Science, 1973, *179*, 311.
12. **Kerdelhue B., Jutisz M., Gillessen D., Studer R. O.** — Biochem. Biophys. Acta., 1973, *297*, 540.
13. **Hichens M., Gale P. H., Schwam H.** — In: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press Inc. New York, 1974, p. 45.
14. **Arimura A., Sato H., Kumasaka T., Worobea R. B., Debeljuk L., Dunn J., Schally A. V.** — Endocrinol., 1973, *93*, 1 092.
15. **Arimura A., Kastin A. J., Schally A. V., Saito M., Kumasaka T., Yaoi Y., Nishi H., Ohkura K** — J. clin. Endocr. 1974, *38*, 510.
16. **Jeffcoate S. L., Fraser H. M., Gunn H., Holland D. T.** — J. Endocrinol., 1973, *57*, 189.
17. **Jeffcoate S. L., Fraser H. M., Gunn A., Holland D. T., White N.** — In: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 1, p. 463.
18. **Kosowicz J.** — In: „IAEA research Coordination meeting on in vitro procedures and techniques", Londra, 29. XI—3. XII. 1976.
19. **Folkers K., Enzmann F., Boler J., Bowers C. Y., Schally A.. V.** — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, *37*, 123.
20. **Burgus R., Dunn T. F., Desiderio D., Guillemin R.** — C. R. Acad. Sci. (Paris), 1969, *269*, 1 870.
21. **Baugh C. M., Krumdieck C. L., Hershman J. M., Pittman J. A. jr.** — Endocrinol., 1970, *87*, 1 015.
22. **Fleischer N., Burgus R., Vale W., Dunn T., Guillemin R.** — J. Clin. Endocr., 1970, *31*, 109.
23. **Bowers C. Y., Schally A. V., Schalch D. S., Gual C., Kastin A. J., Folkers K.** — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, *39*, 352.
24. **Jacobs L. S., Snyder P. Y., Wilber J. F., Utiger R. D., Daughaday W. H.** — J. clin. Endocr., 1971, *33*, 996.
25. **L'Hermite M., Copinschi G., Golstein J., Vanhaelst L., Leclercq R., Bruno O. D., Robyn C.** — Lancet, 1972, *2*, 763.
26. **Prangl A. Y., Lara P. P., Wilson I. C., Alltop L. R., Brbush G. R.** — Lancet, 1972, *2*, 999.
27. **Coppen A., Montgomery S., Peet M., Bailey J., Marks V., Woods P.** — Lancet, 1974, *2*, 433.
28. **Burger H. G., Patel Y C.** — In: „Clinics in Endocrinology and Metabolism" (editor: G. M. Besser), The Hypothalamus and Pituitary, 1977, nr. 1, vol. 6, p. 83, Saunders (W. B.), Londra—Philadelphia—Toronto.
29. **Bassiri R. M., Utiger R. D.** — Endocrinol., 1972, *90*, 722.
30. **Bassiri R. M., Utiger R. D.** — J. Clin. Invest., 1973, *52*, 1 616.
31. **Bassiri R. M., Utiger R. D.** — In: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press Inc., New York, 1974, p. 37.
32. **Grouselle D., Faivre-Bauman A., Tixier-Vidal A.** — In: IAEA Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31. X—4. XII. 1977.
33. **Visser Y. J., Klootwijek W., Docter R., Hennemann G.** — In: IAEA Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31—XI—4. XII. 1977.
34. **Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J., Guillemin R.** — Science, 1973, *179*, 77.
35. **Besser G. M., Mortimer C. H.** — J. Clin. Pathol., 1974, *27*, 173.
36. **Vale W., Brazeau P., Grant G., Nassey A., Burgus R., Rivier J., Ling N., Guillemin R.** — C. R. Acad. Sci. (Paris), Series D., 1972, *275*, 2 913.
37. **Coy D. H., Coy E. J., Arimura A., Schally A. V.** — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, *54*, 1 267.
38. **Martin J. B.** — Endocrinol., 1974, *94*, 497.
39. **Arimura A., Sato H., Coy D. H., Schally A. V.** — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1975, *148*, 784.

Scanned with OKEN Scanner

40. **Brownstein M., Arimura A., Sato H., Schally A. V., Kizer J. S.** — Endocrinol., 1975, *96*, 1 456.
41. **Pimstone B., Kronheim S., Berelowitz M.** — In: IAEA, „Research Coordination Meeting on in vitro procedures and Techniques", Londra, 29. XI—3. XII. 1976.
42. **Hugues J.** — Brain Res., 1975, *88*, 295.
43. **Hugues J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergil L. A., Morgan B. A., Morris H. P.** — Nature (Lond.), 1975, *258*, 577.
44. **Pradelles P., Gros C., Rougeat C., Bepaldin O., Dray F., Llorens-Cortes C., Pollard H., Schwartz J. C., Fournié-Zaluski M. C., Cracel G., Roques B. P.** — In: IAEA Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin vest, 31. XI. —4. XII. 1977.
45. **Garbay-Jaureguiberry C., Roques B. P., Oberlin R., Anteunis M., Lala A. K.** — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, *71*, 558.
46. **Childers S.R., Schwarcz R., Coyle J.T., Snyder S.H.** — In: „The Endorphins" (E. Costa și M. Trabucchi editori), Advances in Biochemical Psychopharmacology, Raven Press, 1978, v. 18, p. 161.
47. **Costa E., Trabucchi M.** — „The Enderphins", Advances in Biochemical Psychopharmacology, Raven Press, 1978 vol. 18.

Scanned with OKEN Scanner

2

HORMONII HIPOFIZEI ANTERIOARE

2.1. HORMONUL DE CREŞTERE UMAN (HGH)

2.1.1. INTRODUCERE

Hormonul de creştere uman (sinonime: hormon somatotrop, în engleză: STH=*somatotropic hormone* sau, mai frecvent uzitat, HGH=*human growth hormone*, sau GH=*growth hormone*) este un hormon proteic cu GM=20 500. El este sintetizat de celulele eozinofile somatotrope ale hipofizei anterioare; sinteza şi eliberarea sa sînt sub controlul hipotalamusului, care exercită inhibiţia tonică prin somatostatină (v. cap. 1). T $^1/_2$ al HGH în circulaţia sanguină este de 25 minute.

HGH are rol important în reglarea metabolismului intermediar, are efecte anabolice şi lipolitice, este un antagonist al insulinei. Efectul său asupra creşterii este rezultatul acţiunii la nivelul cartilajului de creştere prin intermediul somatomedinei.

Hipofiza umană conţine 3—5 mg de HGH. Concentraţia plasmatică a HGH este sub influenţa multor factori endo- şi exogeni.

Hipersecreţia HGH înainte de închiderea cartilajelor de creştere produce gigantismul, iar după maturarea lor produce acromegalia. Deficitul de HGH stă la baza nanismului hipofizar. În insuficienţa hipofizară din sindromul Sheehan sau cea instalată după hipofizectomia chirurgicală sau izotopică, simptomatologia clinică reflectă mai ales insuficienţa celorlalţi hormoni adenohipofizari.

HGH este un hormon cu specificitate de organ şi de specie: anticorpii anti-HGH nu detectează molecule de HGH în alte organe, cu excepţia unor tumori secretante de HGH, iar hormonii altor specii nu dau reacţii încrucişate cu excepţia hormonului de creştere din hipofiza simienelor.

Pînă la introducerea metodei RIA, nu existau tehnici suficient de sensibile pentru a măsura concentraţia hormonului în lichidele biologice.

Scanned with OKEN Scanner

2.1.2. RADIOIMUNOANALIZA HGH

După insulină, HGH este primul hormon pentru care a fost realizat un sistem RIA de dozare (1, 2). Tehnica RIA prezentată aici este cea realizată în 1968 în Institutul de endocrinologie, laboratorul RIA cu trusă proprie (3, 4), progresiv ameliorată.

Imunogenul. HGH este obţinut din hipofize umane după metoda Raben (6) cu unele modificări (7, 8, 9, 10). O cantitate de 0,5—1,50 mg de HGH este solubilizată în 1 ml apă distilată la pH=9—9,5. Hormonul este omogenizat în adjuvant Freund, complet pentru prima inoculare şi incomplet pentru rapeluri.

Antiserul. Iepuri masculi Chinchilla sau New Zealand sînt inoculaţi i.m. şi s.c. cu doze de 0,5—1,0 mg, la intervale de 14 zile. Se prelevează sînge din vena marginală a urechii înainte de fiecare rapel. După 2—3 rapeluri se obţin seruri cu titruri convenabile de anticorpi. Testarea apariţiei anticorpilor şi aprecierea aproximativă a titrului se fac prin tehnica de precipitare cu dublă difuziune în gel de agar. Cînd antiserul nediluat este capabil să dea linie de precipitare cu o concentraţie de 20μg HGH/ml, acest antiser poate fi folosit în tehnica RIA la o diluţie iniţială de 1:100 000. Serul obţinut prin sîngerare la alb este conservat, în porţii mici, ca atare sau diluat 1:10 în tampon albuminat, la —20°C şi poate fi folosit timp de 1—2 ani.

^{125}I—HGH. Preparatul de HGH pentru radioiodurare MRC 69/46 oferit ca şi standardul, liofilizat, este dizolvat şi diluat în tampon fosfat fără albumină şi fiolat în fiole de 1—2 ml, în cantităţi de 5 μg/25 μl. Se conservă congelat pînă la folosire. În momentul folosirii, în fiolă se pune un micromagnet şi se adaugă succesiv ^{125}INa 1,5—2,5 mCi, 25 μl tampon fosfat 0,5 M, pH=7,5 şi 25 μl Cloramină—T (80—100 μg). Se agită magnetic lent 30—60 secunde. Se întrerupe reacţia cu 200 μl metabisulfit de sodiu (240 μg). Amestecul de reacţie este luat într-o pipetă picătoare, se lasă o picătură într-un flacon cu tampon fosfat 0,05 M, pH=7,5 albuminat 5 g ‰, codificat ca produsul A. Restul amestecului de reacţie este lăsat cu grijă pe suprafaţa unei coloane de Sephadex G50 fin, cu dimensiunile de 150—200/10 mm. După spălarea fiolei de marcare de două ori cu cîte 100μl tampon fosfat 0,05 M, se eluează 20—25 probe de cîte 1 ml cu tampon fosfat 0,025 M, pH=7,5. Eluţia se face în eprubete care conţin cîte 1 ml tampon fosfat 0,05 M, pH=7,5 albuminat 5 g ‰. Desfăşurarea procedeului este prezentată în figura II.2.1.

Verificarea purităţii ^{125}I—HGH se face prin trei procedee: precipitarea cu acid tricloracetic (TCA), radiocromatografie şi prin testarea imunoactivităţii în sistem cu exces de anticorp. HGH marcat este considerat adecvat cînd procentul radioactivităţii precipitate cu TCA, rămasă la start la radiocromatogramă şi legată de anticorpul în exces este de peste 90%. Precipitarea cu TCA şi radiocromatograma produsului total de marcare „A" permite calculul activităţii specifice. Activitatea specifică de 50—150 μCi/ μg este adecvată pentru RIA (11). Produsul marcat este diluat în tampon fosfat 0,04 M, pH=7,4 albuminat 2,5 g ‰, la o concentraţie a radioactivităţii de 0,5—1 milion p/m/ml şi se conservă la —20°C. Pentru RIA se folosesc diluţii de 50—200 pg/ml, corespunzător la 5 000—20 000 p/m/100 μl; la această concentraţie, hormonul marcat se conservă la +4°C.

Scanned with OKEN Scanner

Standardul. Pentru calibrarea standardului de laborator se foloseşte preparatul standard internaţional O.M.S., oferit gratuit de „National Institute for Biological Standards and Control" Holly Hill, Hampstead, Londra. Acest preparat, numit 1—IRP (primul preparat de referinţă internaţional),

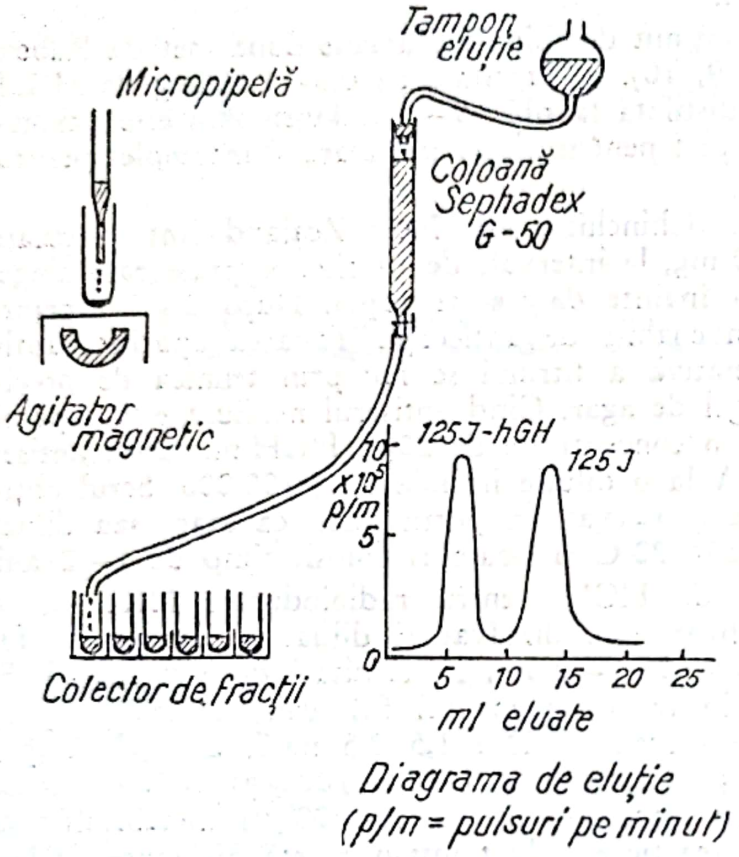


Fig. II.2.1. Reprezentarea schematică a procedeului de iodurare:

Hormon 5 µg	25 µl
Tampon fosfat	25 µl
2 mCi ^{125}I Na aprox.	25 µl
Cloramină-T 80 µg	25 µl
volum	100 µl
Agitare 30 – 60 secunde	
Metabisulfit de sodiu 240 µg	200 µl

special pentru imunoanaliza HGH, este liofilizat în fiole. Conţinutul în HGH al unei fiole este exprimat în termeni de activitate biologică în unităţi internaţionale (UI). O unitate internaţională = 1 milion microunităţi. Un nanogram de HGH este echivalent cu două microunităţi (µU).

La sosire, conţinutul fiolei este dizolvat şi diluat la concentraţii adecvate pentru soluţii stoc. Se conservă în porţii mici, la —20°C. În momentul folosirii, se decongelează o fiolă cu preparat standard cu concentraţia de 200 µU/ml şi se diluează astfel încît să se obţină 5—10 concentraţii între 0,25 şi 20 µU/ml.

Preparatul standard de laborator este un amestec de seruri umane pentru care se calculează concentraţia hormonului folosind curba cu standard 1—IRP—HGH. El se conservă, ca şi standardul internaţional, în porţii mici, congelat.

Probele biologice. Sîngele recoltat pe nemîncate, după 12 ore de repaus fizic şi emoţional este lăsat să separe serul care este centrifugat şi conservat prin congelare. Recoltarea în cursul probelor dinamice se face prin ac heparinat lăsat în venă. *LCR* este recoltat prin puncţie lombară, după prelevarea sîngelui şi conservat ca atare la congelator. *Urina* din 24 de ore este măsurată şi o porţie de cîţiva ml este centrifugată şi congelată ca atare sau V/V cu tampon albuminat.

Scanned with OKEN Scanner

Este necesar ca buletinul de însoţire al probelor să conţină date asupra diagnosticului de prezumţie pentru ca operatorul să se orienteze asupra diluţiei serului în sistemul de dozare.

Tehnica de separare cel mai frecvent folosită este tehnica cu dublu anticorp. Sînt folosite şi separări în fază solidă prin absorbţia anticorpului pe Sephadex, pe polistiren sau separarea cu cărbune-dextran. În trusa descrisă se foloseşte ser de porc sau de capră anti— γ —globuline de iepure.

Condiţiile şi schema de incubare. Incubarea amestecului de reacţie se face la +4°C, cu fază de preincubare de 24 de ore înainte de adăugarea ^{125}I—HGH. Volumul şi ordinea procedurilor sînt prezentate în tabelul 2.1.

Tabelul II.2.1

Schema sistemului RIA-HGH

Eprubeta nr.	Tampon (în µl)	IN 1:200 (în µl)	Standard sau necunoscute (în µl—µU)		IAc cu IN 1:200 (în µl)		125/-HGH (în µl)		IIAc. (în µl)	
1(a)	—	—	—		—	agitare pe vortex; incubare 24 de ore la +4°C	100	agitare pe vortex; incubare 24 de ore la +4°C	—	agitare pe vortex; incubare 24 de ore la +4°C Centrifugare 30 min. la 3 000 t/min.); sucţionare; citirea radioactivităţii
2	300	100	—		—		100		25—100c	
3	300	—	—		100		100		25—100	
4	200(b)	—	100	2	100		100		25—100	
5	200		100	1,5	100		100		25—100	
6	200		100	1,25	100		100		25—100	
7	200		100	1,0	100		100		25—100	
8	200		100	0,75	100		100		25—100	
9	200		100	0,5	100		100		25—100	
10	200		100	0,25	100		100		25—100	
11	200	—	100		100		100		25—100	
12	200	—	100		100		100		25—100	
13	200	—	100		100		100		25—100	
.										
.										
.										
.										

IN = ser iepure normal diluat 1:200;
a) = probe în duplicat, triplicat etc.;
b) = volumul total de incubare în această schemă este de 500 µl; se pot lucra şi cu volum de 300 µl;
c) = volumul este funcţie de titrul precipitant al anticorpului anti-gama-globuline.

Calculul şi exprimarea rezultatelor. Pornind de la numărul impulsurilor înregistrate pentru fiecare din punctele curbei standard, se calculează prin interpolare grafică sau la calculator concentraţia HGH în probele necunoscute.

Rezultatele sînt exprimate în µU/ml în termeni de 1 — IRP — HGH.

Scanned with OKEN Scanner

Sensibilitatea. Cantitatea minimă statistic distinctă de punctul zero al curbei standard este de 0,25—0,5 μU/ml, în funcție de tehnică și de preparatul standard folosit. Preincubarea permite un spor de sensibilitate.

Specificitatea. Unele seruri anti-HGH dau reacții încrucișate cu HPL și cu prolactina umană. În sistemele RIA produse în laboratorul RIA din Institutul de endocrinologie, HPL interferează la concentrații mai mari decît cele observate în cursul sarcinii (12), prolactina umană nu intervine în reacție la concentrații de 20 ng/ml, iar serul anti-HGH nu leagă ^{125}I-Prolactina umană.

2.1.3. APLICAȚII CLINICE

a) *Sînge*

— stabilirea etiologiei deficitului de creștere la copil;
— stabilirea diagnosticului și evoluției în gigantism și acromegalie;
— urmărirea eficienței terapiei în gigantism și acromegalie;
— stabilirea diagnosticului de insuficiență hipotalamohipofizară.

b) *LCR*

Detectarea precoce a extensiei supraselare a tumorilor hipofizare secretante de HGH.

c) *Urină*

Excreția urinară nu reflectă în mod direct modificările conținutului plasmatic sau rata secreției hormonului. Materialul imunoactiv măsurat în urină ar putea fi fragmente ale hormonului circulant, ceea ce ar explica variațiile mari observate cu sisteme RIA care folosesc antiseruri diferite (13).

2.1.4. VARIAȚII ALE HGH SERIC ÎN CONDIȚII BAZALE ȘI ÎN CURSUL PROBELOR DINAMICE

a) *Condiții bazale:* sîngele se prelevează pe nemîncate și în repaus fizic și emoțional.

Normali. Concentrația plasmatică a HGH variază în raport cu *vîrsta:* în serul fătului de 71—223 de zile de gestație se observă variații în limite de 40—1 000 μU/ml; în cordonul ombilical: 10—200 μU/ml (14); la nounăscut și sugar pînă la 12 luni: 200—300 μU/ml (15, 16); la copii de 2—16 ani: 0,5—20 μU/ml. La adulți, valorile bazale variază între 0 și 20 μU/ml.

Nu au fost observate diferențe între *sexe*, cu excepția răspunsului la stresul de venepunctie mai amplu la femei decît la bărbați (13).

Concentrația HGH în ser crește în timpul nopții atingînd în *somn* profund valori de aproximativ 40 μU/ml, creștere supresibilă prin oricare din agenții inhibitori cunoscuți.

Valorile bazale cresc la foame, efort, hipoglicemie, stres și la administrarea a diferiți aminoacizi, L-dopa, glucagon etc. Creșteri cu aproape două ordine de mărime apar în cursul stresului chirurgical (chiar sub perfuzie de glucoză, revenind aproape de normal pînă la terminarea actului operator) (17, 18).

Disfuncții ale hipofizei. În acromegalie nivelul bazal al HGH este crescut cu 1—2 ordine de mărime față de valorile la limita superioară a normalului (19, 20), cu variații la același bolnav de la o zi la alta.

Scanned with OKEN Scanner

În *nanismul hipofizar*, valorile bazale sînt obișnuit nedetectabile sau mici, deși au fost semnalate cazuri cu valori mari, considerate ca datorite unui deficit al receptorilor sau al somatomedinei.

b) *Probe dinamice de inhibiție*

Deoarece sînt acromegalii cu concentrații bazale la limita superioară a normalului, iar valorile bazale observate în nanismul hipofizar nu sînt concludente, sînt necesare probe dinamice.

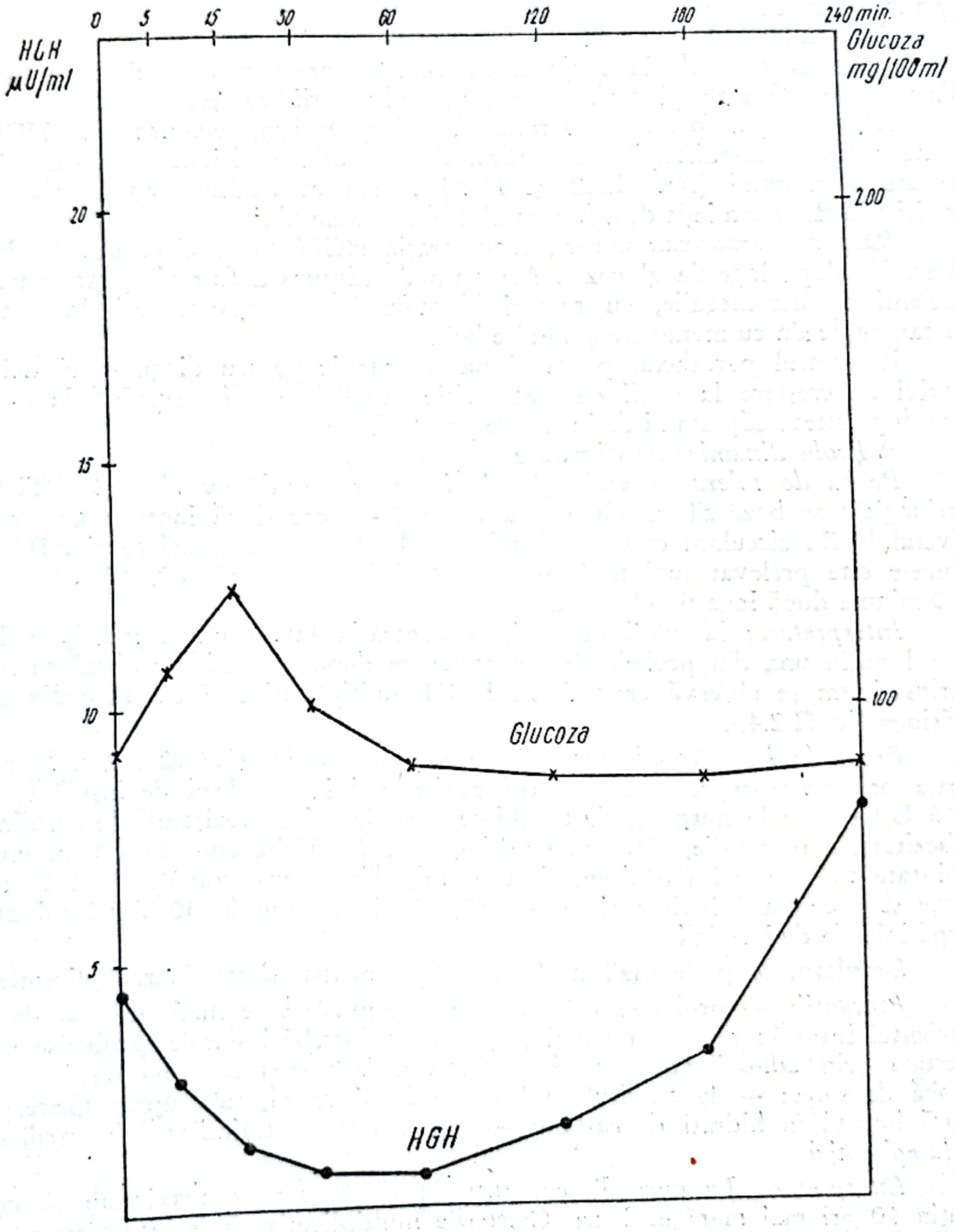


Fig. 11.2.2. Proba de toleranță la glucoză *per os* (PTOG) la persoane normale.

Scanned with OKEN Scanner

Proba de toleranţă orală la glucoză (PTOG): se administrează 50—100 g glucoză (1,5—1,75 g/kilocorp) în 200 ml apă, dimineaţa pe nemîncate, după trei zile fără medicaţie, cu o dietă zilnică (2—3 zile înainte de probă) de 250—300 g hidraţi de carbon.

Probele de sînge se prelevează înainte de administrarea glucozei, la momentul zero şi la 10—30 de minute după inserţia acului în venă pentru a evita stresul de venepuncţie. Apoi se recoltează la 30, 60, 90, 120 şi 150 minute după ingestia glucozei. În paralel, se prelevează probe pe anticoagulant pentru determinarea glicemiei.

Interpretare

Răspuns normal: la majoritatea persoanelor normale, cel puţin una din valorile HGH postglucoză scad sub nivelul valorii bazale.

Răspuns patologic: în acromegalie şi gigantism, concentraţia HGH poate rămîne nemodificată sau scădea, dar nu atinge niciodată valorile observate la normali (fig. II.2.2. şi II.2.3.), ceea ce trădează autonomia secreţiei HGH, care a ieşit de sub controlul hipotalamusului.

Răspuns paradoxal: uneori, concentraţia HGH poate să crească (în loc să scadă) după ingestia glucozei. Acest tip de răspuns a fost observat la unii pacienţi cu acromegalie, cu tumori hipotalamice, la nou-născuţi, la femei cu cancer de sîn cu metastaze şi în alte boli.

Răspunsul paradoxal poate fi patognomonic pentru diagnosticul deficitului de creştere la copii cu malnutriţie proteică gravă, revenind la normal după cîteva săptămîni de încărcare proteică.

c) *Probe dinamice de stimulare*

Proba de toleranţă prelungită la încărcarea orală cu glucoză (PTOG prelungită) se bazează pe observaţia că la 2—4 ore după ingestia glucozei, nivelul HGH circulant creşte multiplicativ. Proba se efectuează ca şi PTOG. Sîngele este prelevat înainte (proba zero) şi la 7, 15, 30, 60, 120, 180 şi 240 minute după ingestia glucozei.

Interpretare: la copii normali, concentraţia HGH creşte multiplicativ în cel puţin una din probele de ser prelevate după glucoză. La obezi cu hiperinsulinism se observă creşteri ale HGH multiplicative şi cu un ordin de mărime (fig. II.2.4.).

Proba la hipoglicemie insulinică sau proba la insulină (21, 22). Dimineaţa pe nemîncate se administrează pacientului i.v. o doză de insulină de 0,15 U/kg corp la normali, de 0,3 U/kg corp la cei cu rezistenţă la insulină (obezitate, acromegalie, sindrom Cushing) sau 0,1 U/kg corp la cei cu sensibilitate la insulină (Addison, insuficienţă hipofizară gravă). Probele de sînge se prelevează înainte şi la 30, 60, 90 şi 120 sau la 30 şi 60 minute după injecţia de insulină.

Simultan, se prelevează probe de sînge pentru determinarea glicemiei.

Precauţii: — proba se efectuează sub supraveghere medicală: — dacă pacientul intră în şoc sau nu mai răspunde la întrebări simple, proba se întrerupe prin administrare i.v. de glucoză, luîndu-se totuşi înainte încă o probă de sînge; — la sfîrşitul probei se administrează, sub supraveghere, o masă bogată în hidraţi de carbon; — proba este contraindicată la cardiaci şi la epileptici.

Interpretare. La normali, concentraţia HGH are un maximum de cel puţin 10 ori mai mare ca baza. Creşterile multiplicative sînt interpretate ca deficit parţial, iar cele procentuale ca deficit hipofizar cert. Dacă concen-

Scanned with OKEN Scanner

tratia HGH nu creşte după insulină, se controlează nivelul glicemiei şi lipsa unui răspuns este considerată certă cînd glicemia a scăzut sub 50 mg/100 ml (fig. II.2.5.).

Proba la glucagon (23, 24) nu are contraindicaţiile probei la insulină. Prezintă avantajul că glucagonul stimulează şi axa hipotalamus — hipofiză —suprarenală.

Se administrează o singură injecţie s.c. de 0,5 mg la copii, de 1,0 mg la adulţi normoponderali şi 1,5 mg la adulţi peste 90 kg. Se prelevează

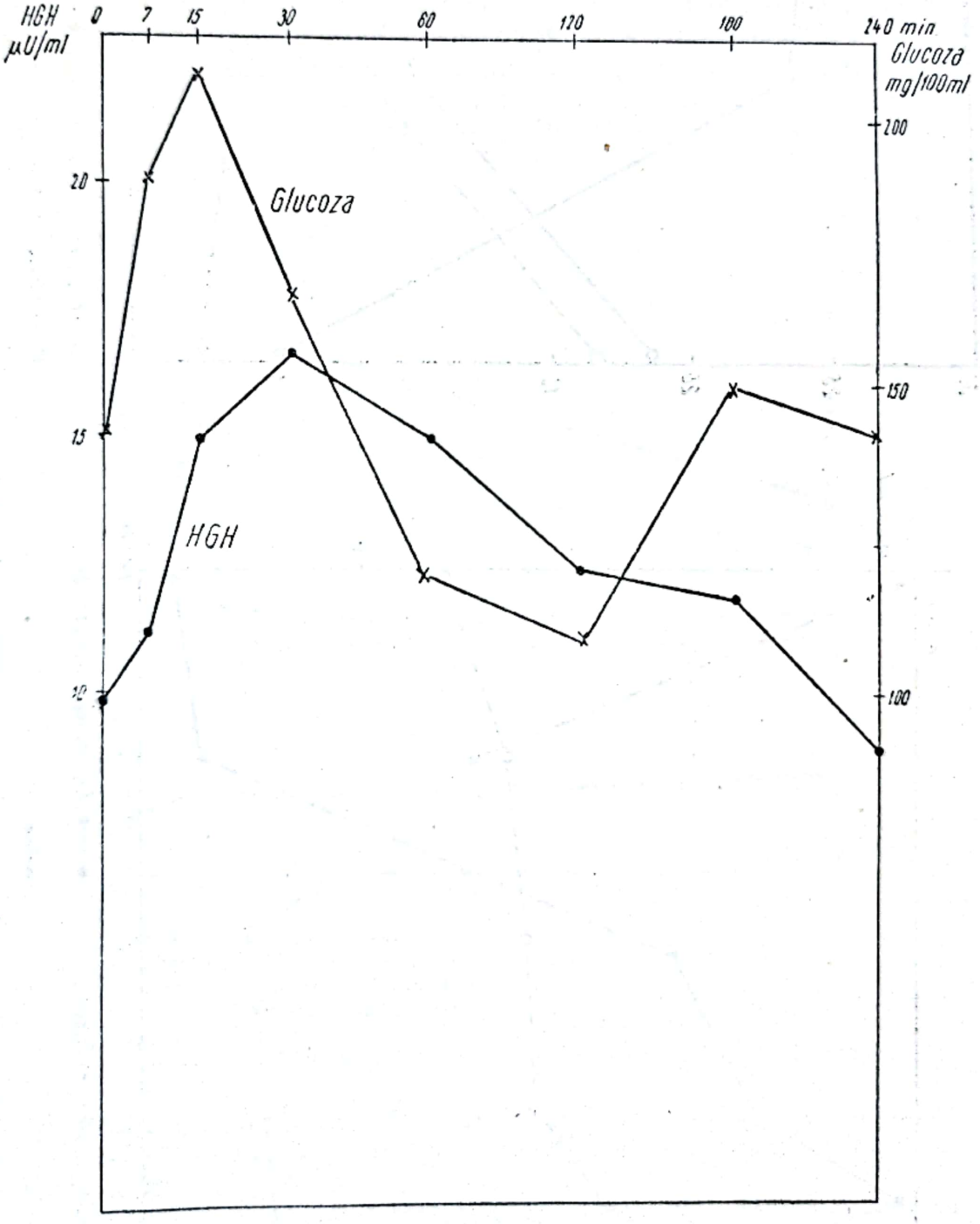


Fig. II.2.3. PTGO la acromegali în evoluţie.

Scanned with OKEN Scanner

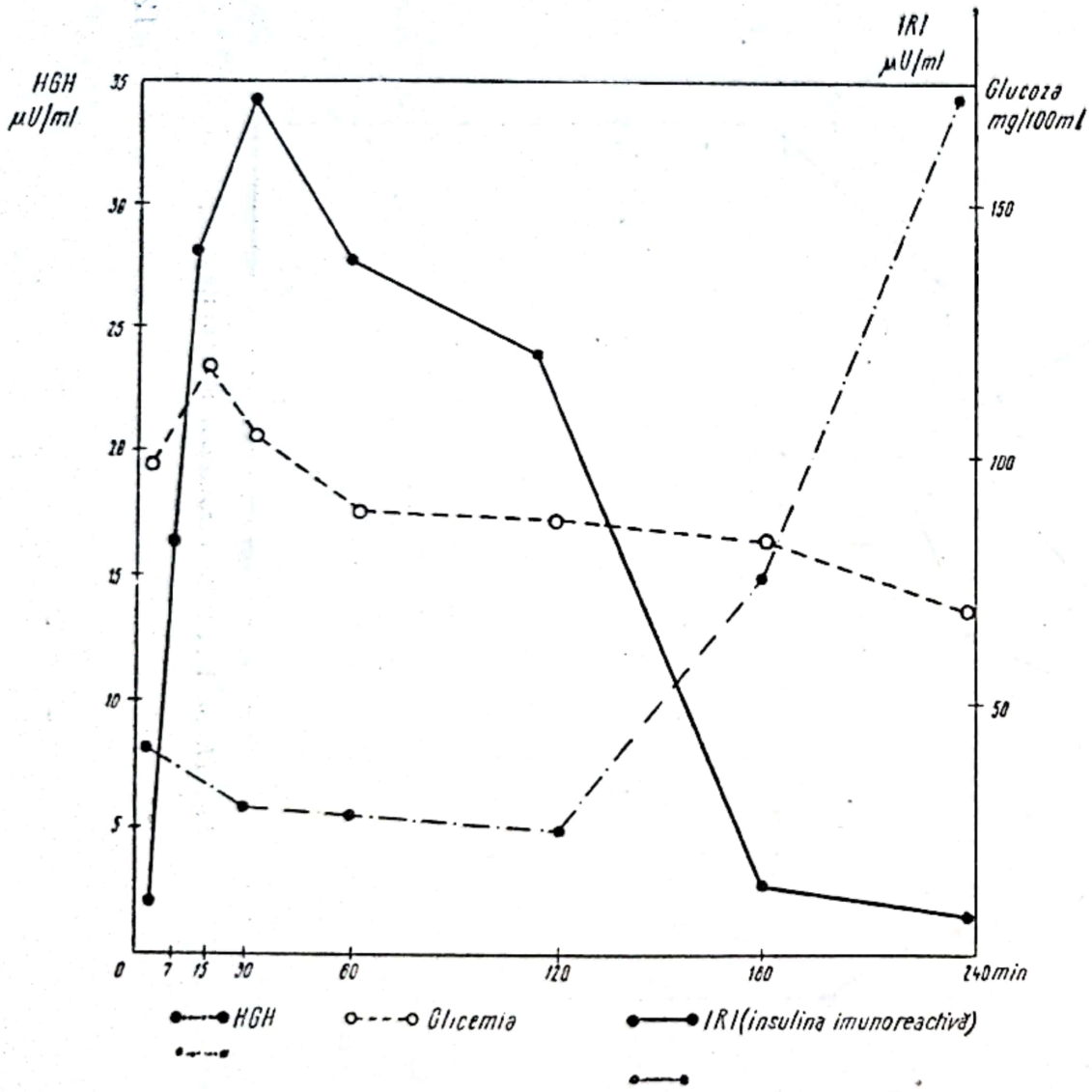


Fig. II.2.4. Valorile HGH la obezi cu hiperinsulinism, în cursul PTOG prelungită.

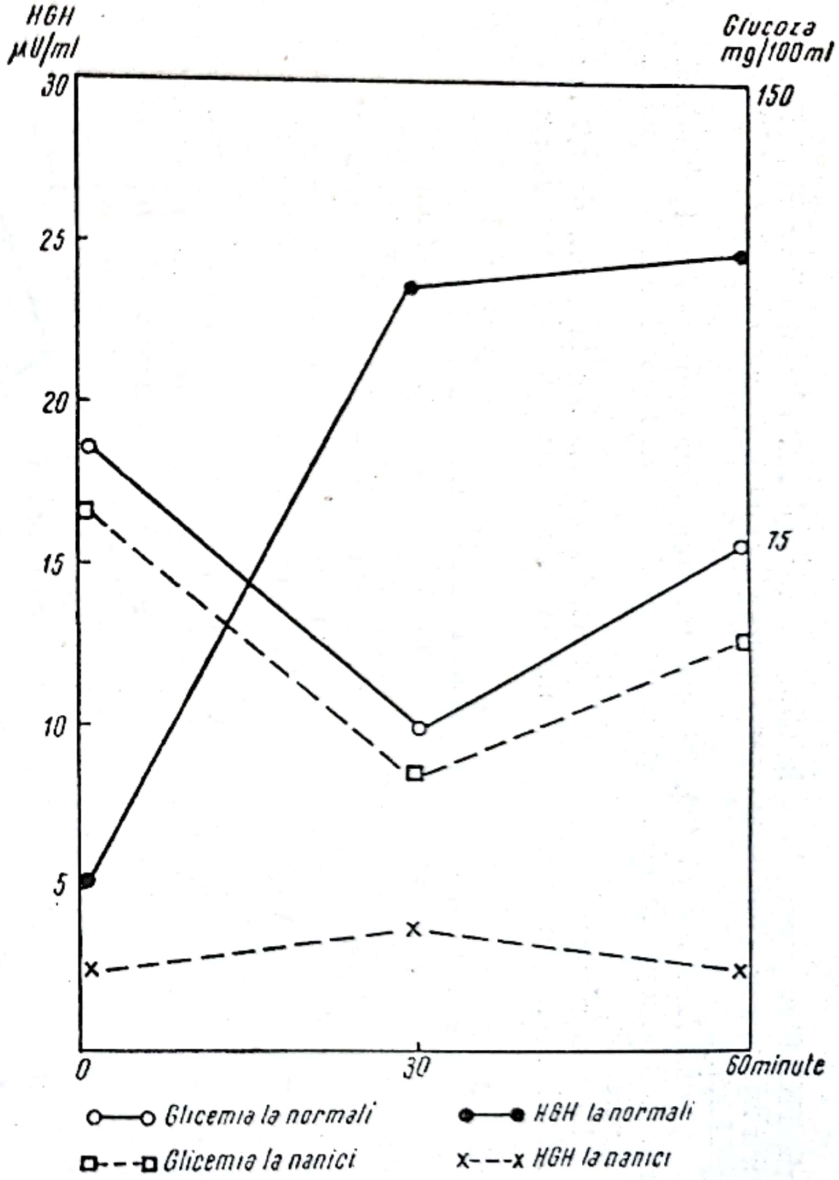


Fig. II.2.5. Valorile glicemiei și ale HGH la copii normostaturali (30 de cazuri) și la copii cu nanism hipofizar (75 de cazuri) în cursul probei la insulină.

Scanned with OKEN Scanner

probe de sînge înainte şi la 60, 90, 120, 150, 180, 210 şi 240 minute post-glucagon.

Interpretare: concentraţia HGH începe să crească la 90 de minute şi atinge valori cu peste un ordin de mărime mai mari decît valoarea de bază.

Proba la arginină. Se administrează în perfuzie i.v. 0,5 g/kg corp arginină hidroclorică. Probele de sînge se colectează înainte de arginină şi la 30, 45, 60 şi 90 minute de la începutul perfuziei.

Interpretare: creşterea maximă a concentraţiei HGH este aproape de acelaşi ordin de mărime ca şi în proba la insulină. Creşteri de aproximativ 10 µU/ml peste nivelul bazal exclud diagnosticul de deficit hipofizar.

Răspunsul HGH la insulină şi la arginină nu concordă totdeauna. De aceea, pentru economie de timp, se pot efectua în aceeaşi zi, secvenţial, probe scurte de cîte 60 minute, întîi proba la arginină şi apoi la insulină.

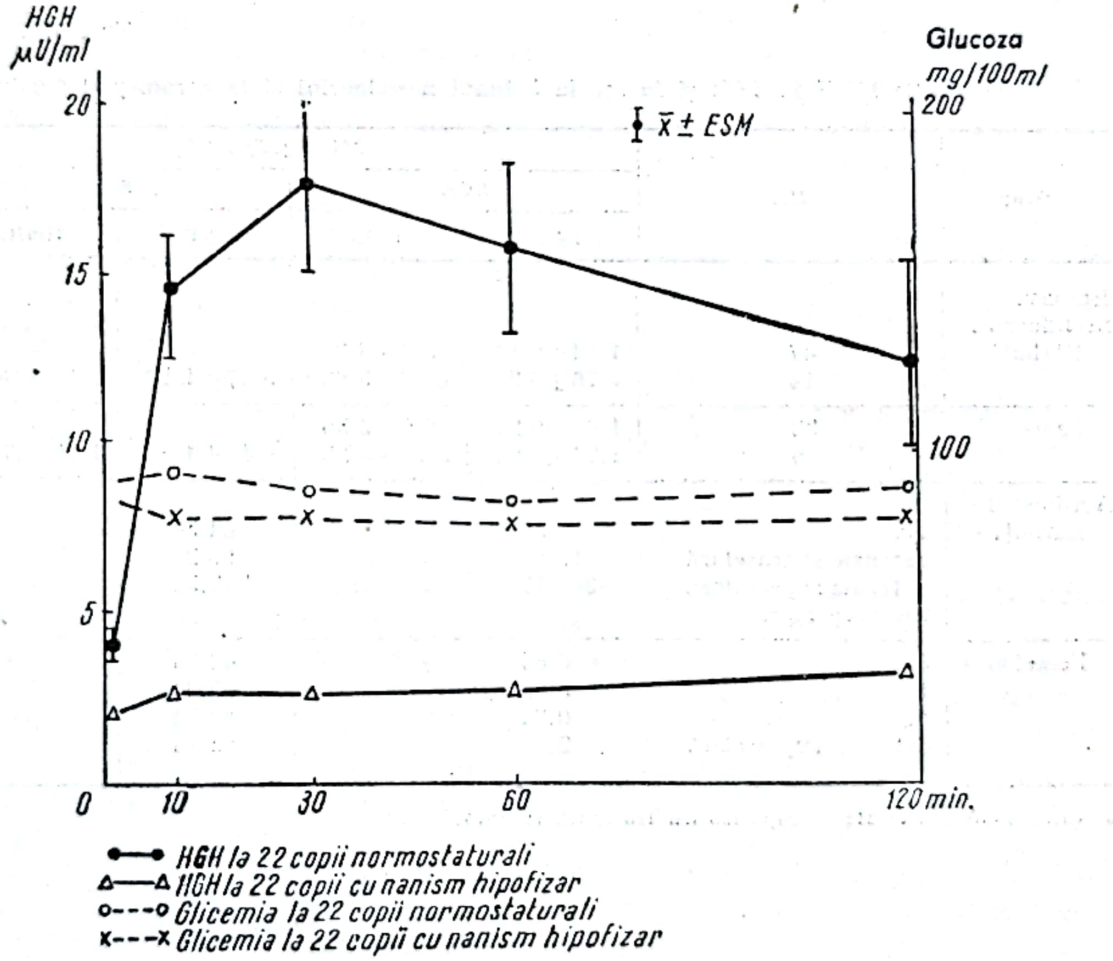


Fig. II.2.6. Valorile HGH şi glucozei în cursul probei la glicină.

Proba la glicină (24, 25, 26). Glicină 250 mg/kilocorp se injectează i.v. în 5—10 minute sub forma unei soluţii 10% disponibilă în farmacii sub numele de glicocol.

Interpretare: răspunsul HGH la copiii normali este comparabil cu cel la insulină, pe cînd la copiii cu nanism hipofizar este absent (fig. II.2.6.).

Scanned with OKEN Scanner

Proba la foame. Se prelevează sînge dimineața, după 12 ore de la ultima masă și apoi după încă 3—6 ore. La normali spre deosebire de hipopituitari, concentrația HGH crește, dar inconstant.

Proba de efort fizic (27). Se recoltează sînge înainte și după 20 de minute de efort viguros (bicicletă ergometrică, urcat și coborît scări rapid sau genuflexiuni). Rezultatul este ca în proba la foame.

2.1.5. CONCENTRAȚIA HGH ÎN LCR

S-a demonstrat că măsurarea HGH în LCR la acromegali poate aduce informații asupra extensiunii supraselare a tumorii (28). Valorile HGH în LCR la normali sînt fie nedetectabile, fie sub 5 μU/ml (tabelul II.2.2. și II.2.3), pe cînd la cei cu tumori supraselare sînt mult crescute (tabelul II.2.3.).

Tabelul II.2.2.

Concentrația HGH în LCR și în ser la bolnavi neendocrini și la acromegali (29)

Grup	Nr.	HGH μU/ml			
		LCR		Ser	
		$\bar{x}\pm ES$	limite	$\bar{x}\pm ES$	limite
Bolnavi neendocrini					
Bărbați	47	1,54±0,14	0,4—4,22	—	—
	14	1,76±0,30	0,56—3,62	5,47±1,17	1,17—18,27
Femei	32	1,60±0,24	0,5—6,36	—	—
	5	1,74±0,54	0,73—3,08	9,42±4,51	1,79—25,55
Acromegalie					
Bărbați a)	Hx	2,59		84,34	
	extensie supraselară	15,93		96,25	
	extensie supraselară tumoare mare	303,17		242,39	
Femei a)	Hx	0,84		42,54	
	Hx fără extensie supraselară	3,92		49,00	
		0,84		42,54	
		2,21		93,14	

a) valori individuale; Hx = hipofizoliză izotopică recentă.

Tabelul II.2.3.

Concentrația HGH în LCR și ser la bolnavi cu stări febrile de cauze diferite (14)

Proba	Nr.	$\bar{x}\pm ES$ μU/ml	Limite
LCR	20	0,7±0,12	0,06—1,35
Ser	20	25,20±7,26	2—115,6

Scanned with OKEN Scanner

2.2. HORMONUL TIREOTROP UMAN (h-TSH)

2.2.1. INTRODUCERE

Locul de sinteză. Hormonul tireotrop (TSH) este secretat de celulele tireotrope al hipofizei anterioare. Conţinutul hipofizei este de 0,02 U/mg de glandă uscată, deci cu aproape 3 ordine de mărime mai mare decît conţinutul circulant total la eutiroidieni.

Natura chimică. TSH este o glicoproteină cu GM 28 000, alcătuită din două subunităţi distincte: α şi β (30). Structura subunităţii α seamănă cu cea a subunităţii α a celorlalţi hormoni glicoproteici, FSH, LH, HCG, fapt care explică reacţia imunologică încrucişată a acestor molecule cu anumite antiseruri. Subunitatea β conferă hormonului specificitatea sa biologică şi specificitatea imunochimică.

Funcţia. La nivelul tiroidei, TSH creşte mărimea şi vascularizarea glandei, înălţimea şi activitatea epiteliului folicular. El stimulează metabolismul iodului în tiroidă, sinteza şi eliberarea hormonilor tiroidieni şi exacerbează consumul de oxigen, sinteza RNA şi a fosfolipidelor şi utilizarea glucozei. Aceste acţiuni au loc prin activarea adenilciclazei, cu formarea cAMP ca urmare a legării TSH la receptorul său specific de pe suprafaţa celulelor foliculului tiroidian.

Reglare şi control. Secreţia tiroxinei (T_4) şi a triiodotironinei (T_3) este reglată de TSH, a cărui sinteză şi eliberare este controlată de hipotalamus prin TRH şi de concentraţia hormonilor tiroidieni circulanţi. Sistemul de control este de tip *feed-back* negativ clasic, scăderea secreţiei hormonilor tiroidieni duce la creşterea TSH pe cînd creşterea lor inhibă secreţia TSH (fig. II.2.7). TRH şi hormonii tiroidieni interacţionează dominant la nivelul celulelor tireotrope hipofizare, unde T_3 în special inhibă răspunsul la TRH, care reglează sensibilitatea tireotropelor la acţiunea hormonilor tiroidieni (31). La nivelul acestei interacţiuni mai pot interveni hormonii estrogeni, corticosteroizii, L-Dopa, iodul (dar şi alţi halogeni) etc.

Iodul are un rol important în autoreglarea funcţiei tiroidiene; după expunerea la doze mari de iod se observă inhibiţia sintezei hormonilor tiroidieni. De aceea, administrarea prelungită a unor doze mari de iod duce, în cele din urmă, la hipersecreţia TSH ca urmare a reducerii *feed-back*-ului negativ prin hormoni tiroidieni (32, 33).

Metodele biologice de cantificare a TSH. Acţiunile biologice ale TSH au servit ca mijloc de estimare cantitativă a hormonului. Aceste metode sînt prea puţin sensibile pentru a urmări concentraţia TSH în lichidele biologice cu excepţia concentraţiilor foarte mari. Ele sînt lipsite de specificitate, deoarece şi alte substanţe cu acţiune de stimulare a tiroidei, ca tireotropul corionic uman şi LATS pot produce efecte similare. Aceste substanţe nu sînt însă înrudite imunochimic cu TSH şi deci nu interferează în sistem RIA.

2.2.2. RADIOIMUNOANALIZA h-TSH

Imunogenul. Deşi a fost folosit şi TSH bovin pentru producerea antiserului utilizat în sistem RIA heterolog (34), obţinerea TSH uman pur (35) a permis dezvoltarea sistemelor RIA omologe pentru TSH uman (36, 37).

Scanned with OKEN Scanner

Antiserul. TSH uman foarte pur în doze de 100—300 μg emulsionat în adjuvant Freund se injectează lunar la iepuri albi timp de 2—4 luni. Se obţine legarea 50% a 0,05—0,1 ng ^{125}I-TSH cu o diluţie iniţială a antiserului

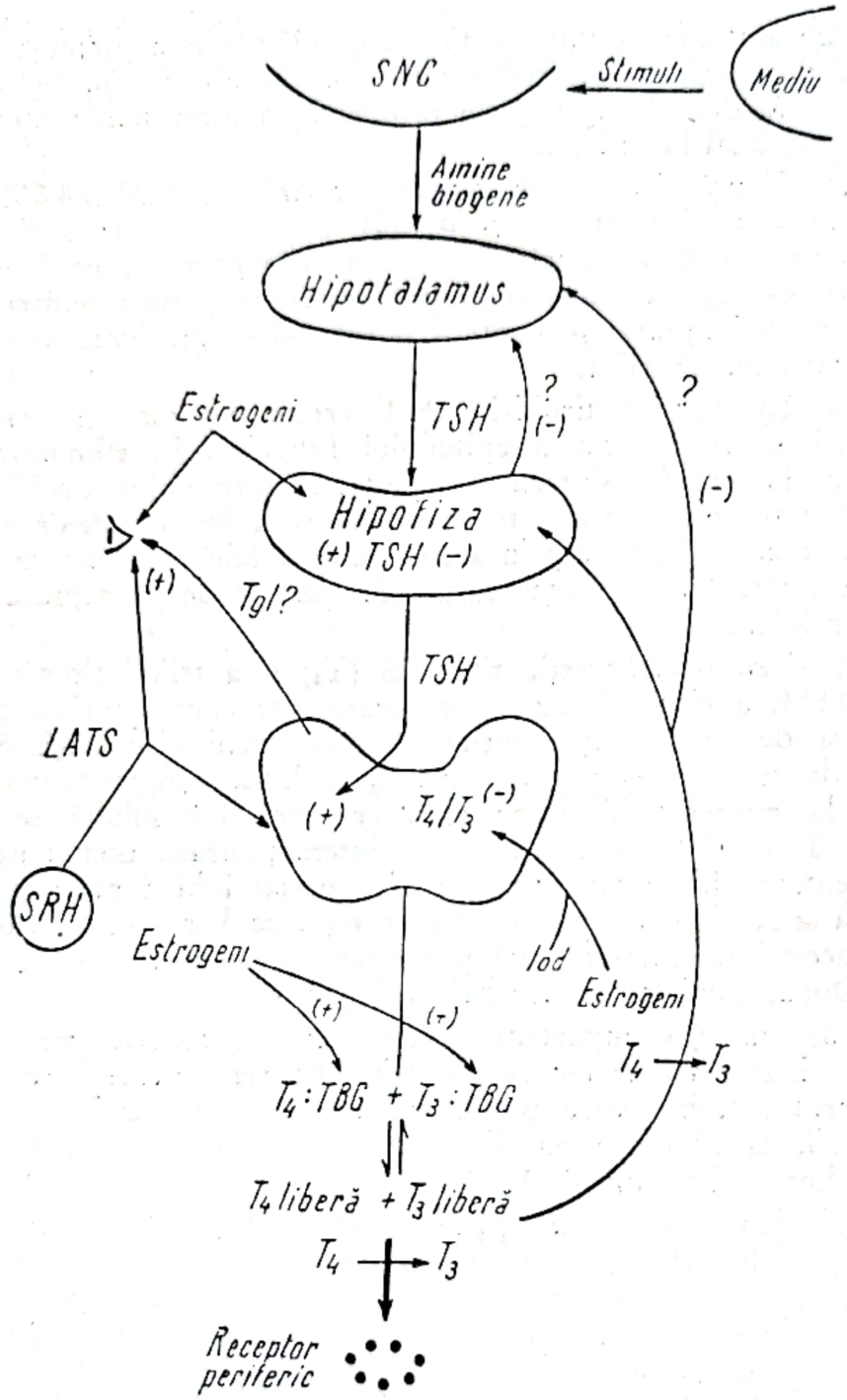


Fig. II.2.7. Reprezentarea schematică a reglării şi controlului funcţiei tiroidiene. (+) = stimulare; (—)=inhibiţie; ?=căi ipotetice; SRH = sistem reticulohistiocitar; LATS = long acting thyroid stimulator; Tgl = tiroglobulina.

de 1:10 000—1:20 000. Afinitatea antiserului permite detectarea a 0,1 ng (0,3 μU) de TSH standard.

Antiserul poate fi obţinut gratuit, împreună cu materialul pentru marcare şi preparatul de referinţă de la NIH-NIAMDD-SUA.

Scanned with OKEN Scanner

Antiserul dă reacţie încrucişată cu LH, FSH şi HCG ca urmare a comunităţii structurale a subunităţii alfa. De aceea se recurge la adsorbţia cu HCG 3 000—5 000 UI/1 ml antiser diluat 1:100, cu incubare 48 de ore la 5°C.

Pot fi preparate şi seruri specifice pentru TSHβ şi astfel adsorbţia nu mai este necesară.

^{125}I-TSH se prepară marcînd TSH uman (de la National Institute for Medical Research-Anglia sau de la NIH-NIAMDD-SUA) cu ^{125}I prin metoda cu cloramina-T. Purificarea se face pe Sephadex G-50 fin pe coloană de 150—200/10 mm. Se obţin activităţi specifice de 50—100 μCi/μg şi aproape 90% ^{125}I-TSH imunoreactiv în exces de antiser.

Prin repurificare pe Sephadex G-100, coloană de 400/10 mm, se obţine o primă fracţiune cu void volumul (primii 20—30 ml) care conţine agregate cu imunoreactivitate redusă urmat de a doua (35—45 ml), de ^{125}I-TSH, pur, apoi urmează fragmente degradate şi ^{125}I (fracţiunea a treia). Pe măsură ce ^{125}I-TSH se învecheşte, fracţiunile I şi III cresc, dar imunoreactivitatea fracţiunii II rămîne constantă (37).

Preparatul de referinţă internaţional este TSH uman recomandat de OMS şi oferit de National Institute for Medical Research — Anglia, cu activitate de 3 U/mg (38).

Probele biologice. Se poate folosi ser sau plasmă. TSH este relativ stabil, nu este influenţat de hemoliză. Probele de sînge sau de LCR pot fi păstrate la temperatura camerei pînă la 48 de ore. Conservarea pe timp mai lung se face la —20°C. Dozarea se face în probele biologice ca atare. S-a utilizat şi preextracţia cu acetonă cu recuperare de 60%.

Sensibilitatea. Diferitele sisteme RIA detectează concentraţii de TSH de 0,6—1,5 U/ml (0,2—0,5 ng/ml).

2.2.3. APLICAŢII

Pregătirea pacientului. TSH nu este influenţat semnificativ de ingestia alimentară, de poziţie, stress sau activitate fizică uzuală. Probele de sînge pot fi recoltate la orice oră, deoarece concentraţia TSH nu se modifică mult în cursul zilei. Pentru proba la TRH se recomandă anumite precauţii.

Proba la TRH. Se suspendă tratamentul cu T_4 cu o lună înainte şi cu T_3 cu 10 zile înainte de proba la TRH. Sînt evitate o serie de medicamente: răspunsul TSH la TRH este exacerbat la bărbaţi de estrogeni şi de dozele mari de antitiroidiene de sinteză la ambele sexe. Răspunsul TSH la TRH este diminuat de doze farmacologice de corticosteroizi, de T_4 şi T_3 şi de tratamentul cronic cu L-Dopa.

Proba la TRH se efectuează administrînd o singură injecţie i.v. de 200 μg TRH. Probele de sînge se recoltează înainte, la 20 şi la 60 de minute după injecţie. Efectele secundare apar adesea, dar sînt uşoare şi nu durează mai mult de 5 minute. Se observă roşeaţă ca la injecţia cu calciu i.v., greaţă, vărsături, palpitaţii, ameţeli, cefalee şi senzaţii de micţiune imperioasă. Injecţia i.v. rapidă poate da reacţii mai grave. Proba poate fi repetată ori de cîte ori este necesar.

2.2.4. REZULTATE ALE RIA-TSH IN SER

In condiţii bazale. La *normali*, concentraţia TSH variază între zero (nedetectabil) şi 6 μU/ml. Secreţia TSH în 24 de ore prezintă două tipuri de

Scanned with OKEN Scanner

ritmuri: un ritm circadian cu valori maxime între orele 21 şi 6 şi minime între orele 16 şi 18 şi, suprapus pe acesta, oscilaţii la intervale scurte (31). Toate aceste fluctuaţii sînt procentuale, ele nedepăşind limitele în condiţii bazale (0-6 μU/ml).

Concentraţia TSH scade în hipertiroidie şi în hipotiroidia secundară (hipotalamică sau hipofizară). În hipotiroidia primară şi după tiroidectomie (chimică, chirurgicală sau radioizotopică), concentraţia TSH creşte în limite largi, de la 10—20 μU la peste 400 μU (fig. II.2.8).

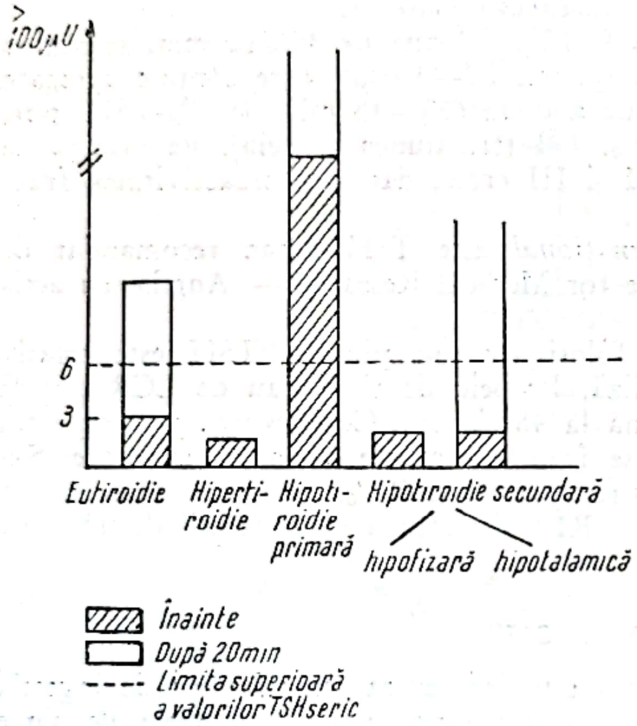


Fig. II.2.8. Concentraţia TSH înainte şi la 20 de minute după TRH (după referinţa 39).

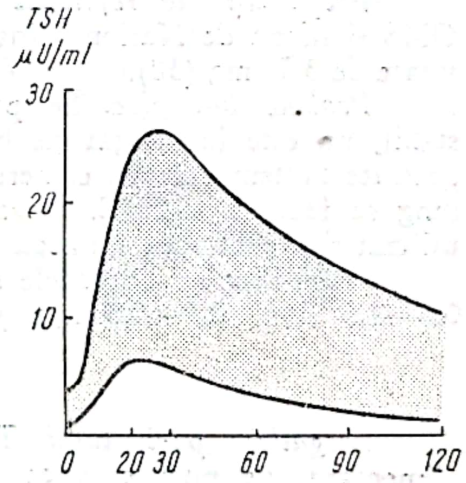


Fig. II.2.9. Limitele de variaţie interindividuală ale răspunsului TSH la doza de 200 μg TRH i.v. la normali.

Răspunsul TSH la TRH. La *normali,* răspunsul la TRH este mai mare la 20 minute decît la 60 minute după injecţie (fig. II.2.9).

Concentraţia TSH nu creşte (răspuns mai mic de 2 μU/ml) în hipertiroidia manifestă, în boala Basedow, în tireotoxicoza T_3, în nodulul hipertiroidian autonom, în supraîncărcarea cu hormoni tiroidieni. Răspunsul TSH la TRH în eutiroidia compensată şi în hipotiroidia subclinică este ca la normali. Răspunsul este exacerbat în hipotiroidia frustă şi în cea manifestă. În hipotiroidia hipotalamică se observă concentraţii mai mari la 60 decît la 20 de minute (fig. II.2.10).

Un răspuns normal al TSH la TRH exclude hipertiroidia, dar absenţa ripostei TSH nu pune diagnosticul de hipertiroidie deoarece riposta TSH la TRH poate lipsi într-o serie de alte situaţii clinice ca: boala Basedow sau hipertiroidia tratată adecvat, adenomul tiroidian autonom, guşa polinodulară. Absenţa răspunsului TSH poate confirma o suspiciune de hipertiroidie sau de autonomie tiroidiană.

Scanned with OKEN Scanner

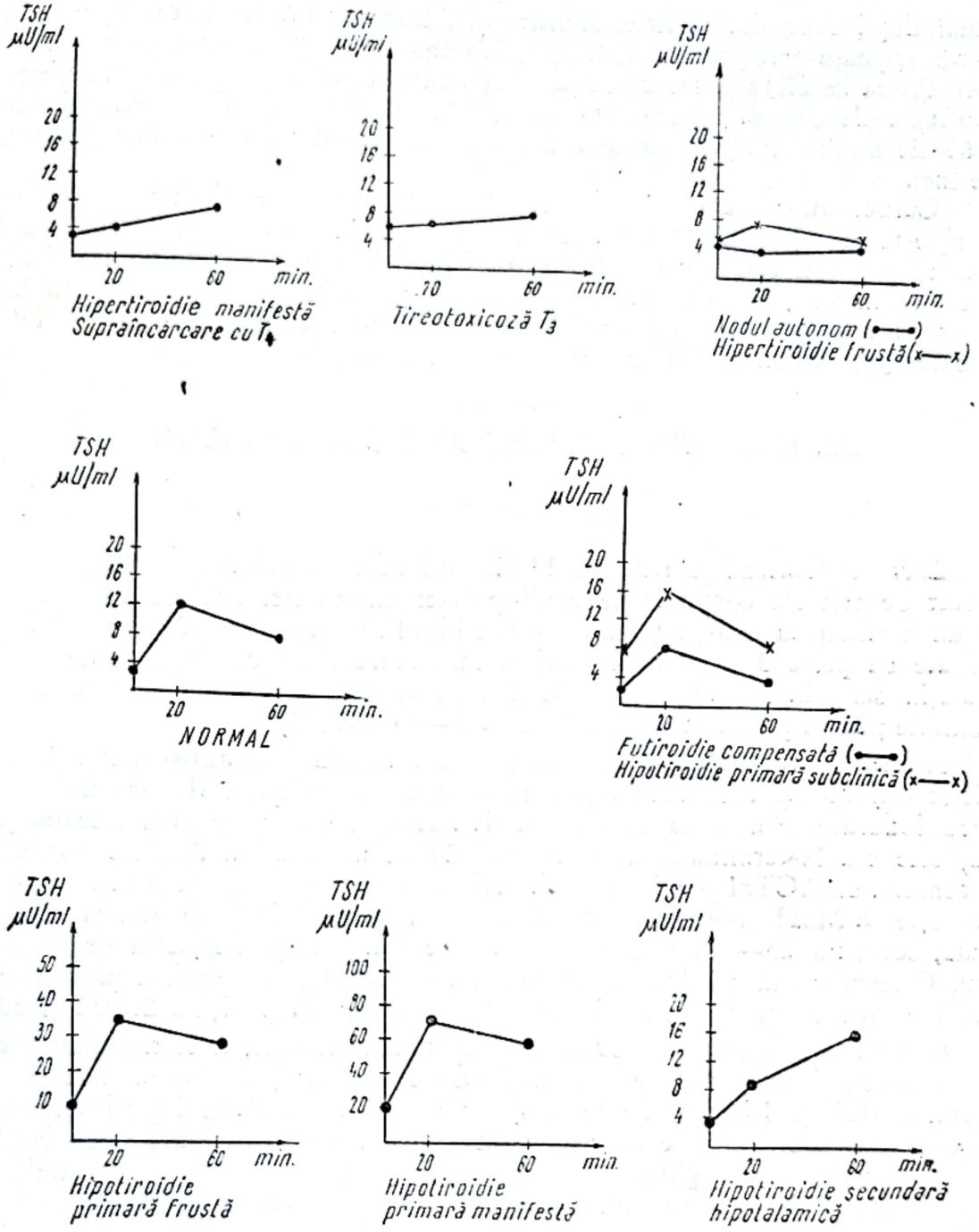


Fig. II.2.10. Dinamica secreţiei TSH în cursul probei la TRH (după referinţa 33).

Absenţa sau alterarea răspunsului TSH la TRH corelează cu absenţa sau cu alterarea supresiei radioiodocaptării (RIC) prin T_3, de aceea, în practica clinică, proba la TRH tinde să înlocuiască proba de supresie cu T_3 (40).

Răspunsul TSH la TRH poate fi absent sau alterat la aproximativ 50% dintre bolnavii cu boli hipofizare, de aceea nu se poate indica terapia de substituţie decît prin coroborare cu probe suplimentare de hipotiroidie. Terapia de substituţie cu hormoni tiroidieni este aplicată în aceste cazuri

Scanned with OKEN Scanner

numai după controlul funcţiei suprarenale, întrucît administrarea hormonilor tiroidieni poate precipita insuficienţa suprarenală.

Proba la TRH poate uşura distincţia între hipotiroidia secundară leziunii hipofizare de cea datorită unor leziuni hipotalamice în care răspunsul TSH la 60 de minute este mai amplu decît la 20 de minute după injecţia tireoliberinei.

Curbele prezentate în figura II.2.10 sînt orientative, limitele de variaţie ale ripostei TSH la TRH fiind destul de largi, la normali însă creşterea la 20 de minute este totdeauna multiplicativă faţă de valoarea bazală (fig. II.2.9). La 60 de minute, valorile TSH nu revin la valoarea iniţială, apoi scad lent şi pot rămîne peste nivelul iniţial încă 1—2 ore. Crescînd doza de TRH peste 200 μg, răspunsul TSH nu devine mult mai amplu.

2.3. HORMONUL ADRENOCORTICOTROP (ACTH)

2.3.1. INTRODUCERE

Locul de sinteză şi rezerve. Hormonul adrenocorticotrop (ACTH) este secretat de celulele corticotrope ale hipofizei anterioare. ACTH ca şi TSH, este un hormon cu glandă ţintă. Rezerva hipofizară este de 0,25 mg (50 UI), cantitate cu peste 3 ordine de mărime mai mare decît cantitatea totală din circulaţia sanguină. Semiviaţa ACTH natural este de 5—15 minute şi de 30 minute pentru preparatul de sinteză (α 1—24 ACTH).

Natura chimică. ACTH este un polipeptid cu GM de aproximativ 4 500, alcătuit din 39 de aminoacizi, printre care două reziduuri de tirozină utile pentru iodurare. Porţiunea biologic activă (răspunzătoare pentru steroidogeneză) este cea N-terminală, alcătuită din 24 de aminoacizi. Această porţiune este comună cu ACTH porcin şi bovin. Din această porţiune, fragmentul 1—13 alcătuieşte α-MSH (hormonul stimulator al melanocitelor). Porţiunea C-terminală, secvenţa 25—39, este porţiunea care conferă specificitatea de specie. Capul C-terminal al ACTH uman diferă de ACTH porcin printr-un aminoacid în poziţia 31 şi de cel bovin prin 3 aminoacizi în poziţiile 29, 30 şi 33.

Funcţia principală a ACTH este comanda producţiei hormonilor steroizi suprarenali. Acţiunea sa fundamentală se exercită la nivelul cortexului suprarenal (CSR). Efectul său morfogenetic se observă după hipofizectomie, cînd cortextul suprarenal se atrofiază începînd cu zona reticulată şi cuprinde apoi fasciculata; zona glomerulară este mai puţin afectată iar medulara rămîne intactă. Atrofia recentă este reversibilă, ea retrocedînd sub efectul ACTH exogen.

Descărcarea corticosteroizilor după injecţia i.v. de ACTH este rapidă: în 2—3 minute se observă creşterea hormonilor CSR în vena suprarenală. Se pare că ACTH intervine în etapele iniţiale ale steroidogenezei. Mecanismul său de acţiune la nivelul CSR implică interacţiunea cu un receptor specific. Sînt semnalate şi unele acţiuni extrasuprarenale ale ACTH.

Reglare şi control. Reglarea secreţiei ACTH este strict legată de secreţia glucocorticoizilor CSR (fig. II.2.11). Cortizolul plasmatic liber (nelegat de proteine) este elementul cheie al retrocontrolului (*feed-back*) negativ. Acesta devine evident după suprarenalectomie, după administrarea glucocorticoizilor, în insuficienţa suprarenală şi în hipercorticism. Scăderea nivelului cortizolului

Scanned with OKEN Scanner

circulant antrenează creşterea ACTH pentru a restabili nivelul iniţial al corticosteroizilor. Dimpotrivă, un exces de cortizol tinde să diminueze sau să suprime secreţia ACTH, care este urmată de scăderea secreţiei corticosteroizilor, ivindu-se riscul atrofiei CSR aşa cum se poate observa în cursul corticoterapiei prelungite. Acest tip de control este numit *feed-back negativ lung*

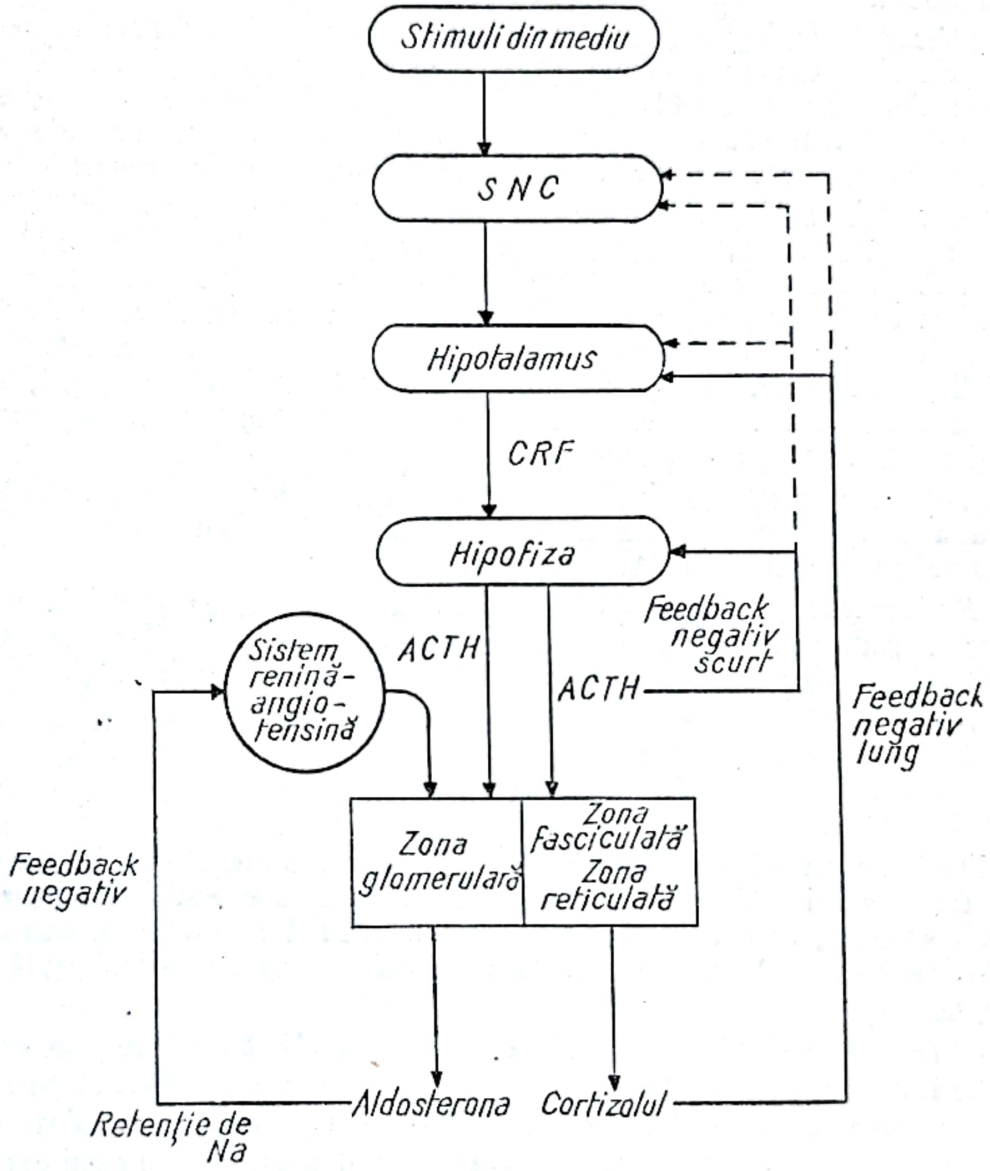


Fig. II.2.11. Schema circuitelor de reglare ale sistemului hipotalamus-hipofiză-CSR: CRF = Corticotrop releasing factor; ⇢ = frenare.

prin comparaţie cu cel *scurt*, care nu depinde de concentraţia cortizolului plasmatic. Acest al doilea tip de retrocontrol constă din influenţa ACTH asupra propriei sale secreţii.

Un alt tip de control, mai rapid, care de asemenea nu depinde de concentraţia cortizolului plasmatic, funcţionînd mai ales ca un dispozitiv de stimulare, este reglarea eliberării ACTH prin factorul de eliberare hipotalamic — CRF — neidentificat încă.

Scanned with OKEN Scanner

2.3.2. METODE DE CANTIFICARE

Disocierea previzibilă a activității imunochimice de activitatea biologică a fost studiată prima oară pe molecula de ACTH, datorită metodelor biologice de dozare a ACTH sensibile și relativ simple (41, 42). De aceea, relația structură-funcție a ACTH este mult mai clar conturată decît pentru alți hormoni.

Metodele biologice bazate pe efectele majore ale ACTH: depleția acidului ascorbic din suprarenală (43), scăderea numărului limfocitelor și al eozinofilelor circulante (44) și modificarea greutății suprarenalei și a timusului (45) sînt lipsite de specificitate și prea puțin sensibile. Ele au fost înlocuite cu metode bazate pe efectele ACTH asupra steroidogenezei.

Metodele biologice bazate pe răspunsul corticosteroizilor suprarenali in vivo (46, 47, 48,) sau *in vitro* (49) sînt specifice și sensibilitatea lor poate fi sporită prin folosirea celulelor suprarenale izolate (50). Modificarea proceselor de oxidoreducere în celulele suprarenale după stimularea cu ACTH a permis dezvoltarea unei tehnici colorimetrice de cantificare a ACTH cu o sensibilitate de ordinul a 20 de femtograme/ml (1 fg = 10^{-15} g) (51, 52, 53). Tehnica prezintă inconvenientul că microdensitometrul este un aparat costisitor și randamentul lui este redus (54).

Toate aceste tehnici sînt specifice și sensibile, totuși sînt prea laborioase pentru a fi utile în practica clinică; reprezintă însă un instrument prețios pentru validarea metodei RIA.

Radioreceptor analiza (*RRA*) combină sensibilitatea dată de folosirea trasorului radioactiv cu specificitatea metodei biologice. Tehnica RRA a ACTH folosește ca receptor membrane de celule suprarenale solubilizate (55, 56, 57).

2.3.3. METODA RIA PENTRU ACTH

Deși metoda RIA pentru ACTH a fost dezvoltată încă din 1964 (58), totuși este rareori solicitată de clinicieni deoarece este mult mai ușor să se dozeze cortizolul, care arată indirect nivelul ACTH în multe situații clinice. În plus, tehnica RIA pentru ACTH prezintă o serie de dificultăți (42, 54, 58, 59, 60, 61).

a) *Imunogenul.* Sînt folosite preparate de ACTH obținut prin extracție sau preparate de sinteză. Toate preparatele comerciale de ACTH pot determina formarea anticorpilor. Preparatele de extracție folosite sînt ACTH porcin, zinc-ACTH porcin, ACTH uman parțial purificat, carboximetil-celuloză ACTH; se pare că zinc-ACTH are absorbția cu durată mai lungă. Toate preparatele de extracție sau de sinteză sînt emulsionate în adjuvant. Orice preparat de sinteză α 1—24 ACTH (Synacten — Ciba — Geigy sau Cortrosyn — Organon) cuplat cu tiroglobulină sau cu BSA prin metoda cu carbodiimidă poate servi ca imunogen. Doza de imunogen este de 20 UI pentru ACTH de extracție și de 1,0 mg de conjugat α 1-24-ACTH-proteină la prima inoculare, urmată de rapeluri cu doze de 50—100 μg.

b) *Antiserul.* Cobaiul, iepurele și oaia sînt speciile folosite pentru imunizare. Antiseruri cu titruri convenabile se obțin greu, de aceea se imunizează

Scanned with OKEN Scanner

un număr mare de animale folosind o varietate de scheme de imunizare (54, 61). Virtuţile metiraponului ca blocant al secreţiei corticoizilor suprarenali administrat în timpul imunizărilor pentru a împiedica imunosupresia prin cortizonul endogen nu au fost confirmate (61). Cele mai bune antiseruri permit dezvoltarea unor sisteme RIA suficient de sensibile pentru a detecta concentraţia bazală a ACTH în plasma neprelucrată prin extracţie. Asemenea antiseruri se obţin rar (58, 59).

Titrurile obţinute variază între 1:10 000 şi 1:100 000.

Dacă imunizarea se face cu ACTH de extracţie care conţine impurităţi, anticorpii faţă de contaminanţi perturbă sistemul RIA dacă leagă ACTH marcat. De aceea este important ca ACTH folosit pentru radioiodurare să fie foarte pur.

Caracterizarea serului anti-ACTH include: porţiunea din molecula de ACTH pentru care are afinitate anticorpul şi reacţia încrucişată cu α-MSH (hormonul stimulator al melanocitelor) cu structura chimică a secvenţei 1—13 din molecula de ACTH. Se pare că MSH este prezent numai în hipofiză, nu şi în plasmă. Cum α-MSH prezent în hipofiză reprezintă numai 1—3% din activitatea biologică a MSH, molecula de β-MSH (22 aminoacizi) reprezintă aproape 80% din activitatea MSH hipofizar. β-MSH este prezent şi în plasmă şi a fost dezvoltat un sistem RIA pentru aprecierea concentraţiei sale în circulaţia sanguină. Totuşi, începînd din anul 1974 (62), existenţa β-MSH este pusă în discuţie ca un artefact de extracţie a ACTH. Problema nu este clarificată încă, dar multe observaţii pledează împotriva existenţei β-MSH (63).

c) *ACTH marcat.* Ca regulă generală, se impune ca ACTH destinat marcării să fie foarte pur, iar după marcare să se ia măsuri pentru prevenirea adsorbţiei sale pe pereţii flacoanelor, eprubetelor etc. Preparatele de ACTH indicate pentru marcare sînt preparate de extracţie ca ACTH uman foarte pur, sau de sinteză ca α_h 1—39 ACTH distribuit de U. S. National Pituitary Agency prin Hormone Distribution Officer, NIAMDD-NIH, Bethesda, Maryland 20 014, S.U.A. Mai sînt folosite şi preparate de ACTH porcin foarte purificat (Organon Labs. sau Schwartz-Mann Research Labs. Inc.) şi ACTH ovin. Şi preparate de sinteză de tip 1—24 ACTH ca Synacthen (Ciba) pot fi iodurate.

Marcarea se face prin metoda cu cloramină-T cu unele modificări (54, 61). Se obţin activităţi specifice suficient de mari (200—400 μCi/μg). Pentru conservarea ACTH marcat se foloseşte un amestec de acetonă-acid acetic sau plasmă pentru a evita adsorbţia pe pereţii flaconului. Conservarea se face prin congelare.

d) *ACTH standard.* Preparatul standard trebuie să fie foarte pur, iar rezultatele se exprimă în unităţi de greutate pentru a evita erorile de apreciere a activităţii biologice şi faptul că porţiunea bioactivă cu cea imunoactivă nu corespund totdeauna (61). Conversiunea unităţilor biologice în unităţi de greutate se face pe baza standardelor internaţionale: al doilea şi al treilea standard internaţional de ACTH conţin 1,14 şi respectiv 100 UI/mg. A fost adoptată o notaţie explicită pentru exprimarea rezultatelor: α ACTH înseamnă molecula de hormon nemodificată, în dreapta jos se notează specia şi în stînga sus secvenţa, de exemplu α_h^{1-24} ACTH înseamnă ACTH uman, secvenţa 1—24.

Scanned with OKEN Scanner

ACTH uman de extracţie preparat de dr. A. Lesner adecvat ca standard se poate obţine de la NIAMDD-NIH (acesta are activitate biologică de 99—139 U/mg) sau de la Division of Biological Standards, National Institute for Medical Research, Mill Hill, Londra, N.W.7.

Sînt folosite şi preparate de ACTH de sinteză ca α_h^{1-39} (Ciba-Geigy Ltd) distribuit tot de NIAMDD-NIH, sau ACTH sintetic Ferring Ab., POB 9007, Malmö 9, Suedia.

Preparatele standard sînt disponibile în cantităţi mici, de aceea este necesară o atenţie specială la conservarea lor. De exemplu, conservarea în amestecul acetonă-acid acetic deşi conferă stabilitate moleculei de ACTH, fiind volatil nu se poate menţine o concentraţie constantă. Conservarea în HCl 0,003—0,005 M este indicată numai pentru soluţiile stoc nu şi pentru soluţia de lucru din cauza pH-ului foarte coborît care împiedică reacţia antigen-anticorp. Se mai poate recurge la conservarea în plasmă umană eliberată de ACTH endogen prin recoltare de la persoane tratate cu doze mari de glucocorticoizi sau de la persoane care au primit din 8 în 8 ore cîte 1 mg de dexametazonă, timp de cel puţin 2 zile şi de la bolnavi cu hipofizectomie totală. Plasma umană expirată tratată cu cărbune sau cu silicaţi pentru îndepărtarea ACTH endogen este o altă cale de a obţine plasmă fără ACTH.

e) *Probe biologice*

Recoltarea. Pierderea imunoactivităţii ACTH este mai rapidă în sîngele total. De aceea sîngele este colectat în eprubete răcite pe gheaţă şi centrifugate imediat la o centrifugă cu răcire, se separă imediat plasma şi se îngheaţă la —20°C. Transportul la distanţă al plasmei se poate face, fie în eprubete de polistiren menţinute pe gheaţă carbonică într-un conteiner din plastic expandat, fie se adaugă N-etil-maleimidă ca conservant (61).

Anticoagulante ca heparina, cînd este în exces, pot interfera adsorbţia ACTH pe silicaţi. EDTA în cantitate de 14 mg pentru 10 ml sînge are şi avantajul că inhibă enzimele care degradează ACTH.

Serul nu poate fi folosit deoarece în intervalul de timp necesar pentru formarea cheagului, ACTH este degradat.

Cînd ACTH din plasma totală nu se adsoarbe pe sticlă dar ACTH din alte lichide biologice ca *LCR* se adsoarbe, se face un amestec v/v de LCR cu plasmă-ACTH free.

Dozarea ACTH în *urină* nu are sens, hormonul fiind distrus în timpul excreţiei.

Cînd se dozează ACTH în ţesuturi (hipofiză, tumori, culturi de celule) acestea se conservă în eprubete care nu adsorb ACTH ca cele din politetrafluoretilen (PTFE sau Teflon).

Conservarea. Probele de plasmă pot fi conservate ca atare la —20°C timp de un an. Extractele de plasmă pot fi conservate în eluatul acetonă-acid acetic la —20°C, ca atare sau după liofilizare.

Extracţia ACTH din plasmă. Determinarea ACTH se poate face în plasma ca atare dacă sistemul RIA este suficient de sensibil.

Extracţia ACTH din plasmă este necesară adesea cu scopul de a creşte sensibilitatea, de a reduce interferenţa nespecifică a altor constituenţi plasmatici şi a factorilor de legare, de a reduce degradarea prin incubare a hormonului marcat (61). Au fost descrise mai multe sisteme de extracţie a ACTH (54, 61, 64). Multe din aceste metode de extracţie sînt laborioase.

Scanned with OKEN Scanner

O metodă mai simplă foloseşte afinitatea ACTH pentru sticlă şi alţi silicaţi, ca talcul; de exemplu adsorbţia plasmei cu silicaţi şi eluţie cu acid acetic sau cu acetonă-acid acetic este folosită în multe laboratoare (54, 61, 65). Dacă se lucrează cu plasmă supusă extracţiei, atunci şi standardul trebuie tratat ca şi plasma (61). În final, se aplică tehnica de calcul a recuperării pentru a obţine factorul de recuperare necesar pentru corecţia concentraţiei ACTH în plasmă (61).

Extracţia ACTH din ţesut. Ţesutul poate fi prelucrat prin extracţie imediat sau după congelare. Pentru ţesuturi cu concentraţie mare de ACTH ca hipofiza, este suficient un procedeu de extracţie pe cînd în cele cu concentraţie mică (placentă, tumori), extracţia trebuie urmată de purificare (54).

f) *Incubarea reactivilor.* Tehnica RIA pentru ACTH impune anumite rigori în cursul incubărilor, abaterile avînd repercusiuni asupra sensibilităţii sistemului:

— evitarea adsorbţiei ^{125}I-ACTH pe sticlă, folosind eprubete şi dispensere din material plastic;

— evitarea degradării ^{125}I-ACTH prin incubare numai la +4°C, cu concentraţie mică a reactivilor, în special a plasmei, şi folosirea inhibitorilor enzimatici;

— sporirea sensibilităţii prin preincubare, alegerea intervalului optim de incubare şi concentraţie mică a ^{125}I-ACTH în sistem.

g) *Separarea hormonului legat de cel liber* se poate face prin multe tehnici: cromatoelectroforeza, dublu anticorp, răşini schimbătoare de ioni, dioxan, talc sau Quso, cărbune-dextran, polietilenglicol (PEG).

h) *Sensibilitatea* diferitelor sisteme realizate este de 1—10 pg/ml de probă de testat. Scara dozelor se desfăşoară în intervalul de la 1—500 pg/ml.

i) *Specificitatea.* Cu un sistem RIA cu ser de iepure anti-ACTH porcin şi ^{125}I-ACTH uman (1—24 şi 1—39) pot fi dozate ACTH uman, porcin, bovin, ovin şi de şobolan (61), deoarece diferenţele de structură sînt minime (52, 54).

2.3.4. APLICAŢII CLINICE ŞI REZULTATE

Dozarea ACTH are puţine indicaţii clinice în scop diagnostic: este mult mai convenabilă dozarea cortizolului.

a) *Hiperfuncţia CSR.* Determinările de ACTH nu stabilesc diagnosticul de sindrom Cushing dar au o valoare enormă pentru stabilirea etiologiei la bolnavii cu diagnostic sigur de sindrom Cushing.

Situaţiile clinice generate de creşterea ACTH (endogen) în circulaţie sînt boala Cushing prin hipersecreţie de ACTH hipofizar şi sindromul Cushing prin secreţie ectopică (tumorală) de ACTH. La acestea se mai poate adăuga sindromul Cushing iatrogen, ca urmare a administrării prelungite de ACTH în scop terapeutic. Problema principală care se poate rezolva prin dozarea ACTH în boala Cushing este diferenţierea acestei entităţi de sindromul Cushing[1] datorit unei anomalii primare suprarenale prin adenom sau carcinom al CSR (fig. II.2.12).

---

[1] Sindromul Cushing este termenul uzual pentru desemnarea semnelor şi simptomelor care apar prin creşterea prelungită, inadecvată, a nivelului circulant al glucocorticosteroizilor liberi.

Scanned with OKEN Scanner

b) *Hipofuncţia CSR.* Insuficienţa suprarenală poate fi *secundară* unei disfuncţii hipotalamice sau hipofizare şi atunci ea este asociată cu semne şi simptome clinice de hipofuncţie şi a altor glande, de exemplu hipotiroidie şi hipogonadism, de asemenea secundare. Ea mai poate apare ca o consecinţă a efectului supresor al unor doze farmacologice de corticosteroizi administraţi

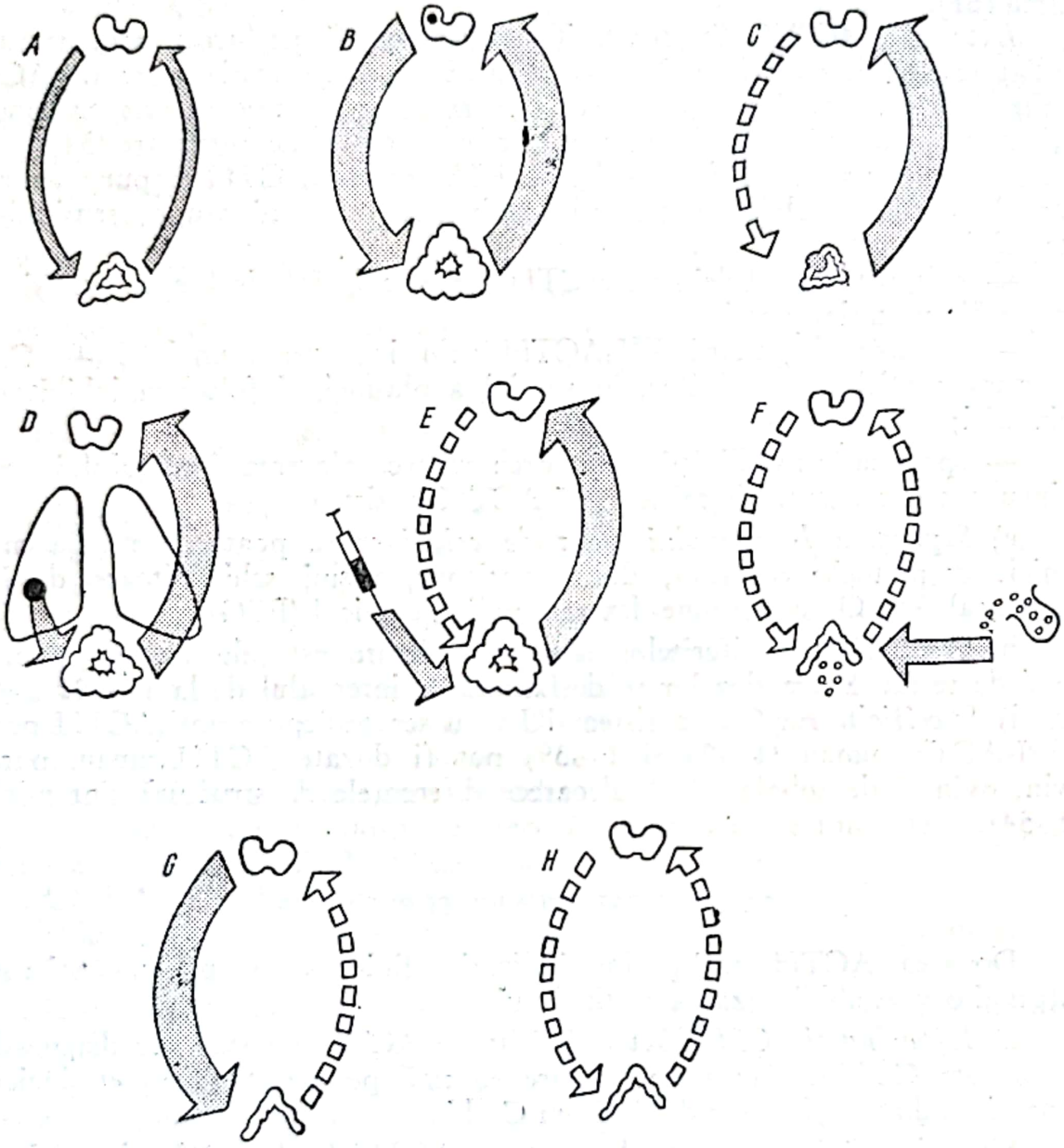


Fig. II.2.12. Patogenia sindromului Cushing şi a insuficienţei CSR (referinţa 66 completat): *A* — axa hipofiză–CSR normală; *B* — boala Cushing. Originea: tumoare hipofizară. Rezultat: hiperplazie CSR bilaterală. *C* — Sindrom Cushing. Originea: tumoare CSR. *D* — Sindrom Cushing. Originea: ACTH ectopic (carcinom pulmonar). *E* — Sindrom Cushing (iatrogen). Originea: terapie cu ACTH. *F* — Sindrom Cushing (iatrogen). Originea: terapie cu glucocorticoizi. *G* — Insuficienţă CSR primară (atrofia CSR). *H* — Insuficienţă CSR secundară. Originea: hipofuncţie hipofizară.

cronic (fig. II.2.12). Simptomatologia clinică este de obicei mai puţin gravă decît în forma primară, întrucît axa renină-angiotensină-aldosteronă rămîne intactă.

Insuficienţa suprarenală *primară* este de obicei de origine autoimunitară, dar mai poate fi datorită unor infecţii (TBC, amiloidoză), care ating şi

Scanned with OKEN Scanner

CSR. Simptomatologia clinică reflectă alterarea secreţiei cortizolului şi a aldosteronei. Secreţia cortizolului mai poate fi alterată prin defecte genetice la nivelul sistemelor enzimatice care intervin în sinteza sa. Cele mai cunoscute sînt defectul de 21-hidroxilare (cu o incidenţă de 1 la 5 000 de naşteri), defectul de 11 β-hidroxilare şi de 17 α-hidroxilare. În cazul primelor două tipuri de defecte apare un deficit în sinteza cortizolului, mecanismul de control prin *feed-back* negativ este perturbat şi concentraţia sanguină a ACTH creşte ducînd la hiperplazie suprarenală congenitală bilaterală cu secreţia excesivă a hormonilor androgeni şi virilizare. În acest caz, dozarea ACTH, a 17-alfa-hidroxiprogesteronei plasmatice şi a pregnantriolului urinar (toate crescute) permit diagnosticul precoce al deficitului enzimatic şi controlul terapeutic cu corticosteroizi exogeni.

c) *Indicaţii clinice pentru dozarea ACTH.* Accesibilitatea măsurării cortizolului plasmatic şi a steroizilor CSR urinari (11-oxi, 17-hidroxisteroizi etc.), care reflectă indirect secreţia ACTH, fac ca determinarea ACTH să aibă indicaţii destul de limitate în clinica umană. În plus, majoritatea tehnicilor RIA necesită prelucrarea plasmei pentru extracţia ACTH, exceptînd cazul în care anticorpul este suficient de specific pentru a permite dozarea în plasma ca atare.

Dozarea ACTH nu are nici o indicaţie pentru investigarea hirsutismului, a pubertăţii întîrziate şi a insuficienţei hipofizare.

Situaţii clinice în care dozarea ACTH este utilă:

— pentru stabilirea etiologiei (nu a diagnosticului) sindromului Cushing;

— pentru supravegherea terapiei bolnavilor cu sindrom Cushing;

— pentru diagnosticul diferenţial între insuficienţa suprarenală primară şi cea secundară;

— pentru supravegherea terapiei de substituţie la bolnavii cu sindrom adrenogenital.

d) *Probele dinamice.* Măsurarea ACTH plasmatic în condiţii bazale are o valoare diagnostică limitată, de aceea se recurge la investigarea variaţiilor nictemerale şi la riposta hormonului în cursul probelor de stimulare sau de frenare (tabelul II.2.4 şi fig. II.2.13).

Tabelul II.2.4.

Probe pentru investigarea funcţiei axei hipotalamus-hipofiză-CSR

I. *Condiţii bazale*

Cortizol sau ACTH plasmatic pe o singură probă.
Excreţia urinară pe 24 de ore a corticosteroizilor (de exemplu 11-OH-CS)

II. *Probe dinamice*

A) Pentru integritatea mecanismelor de reglare şi control:
i) Ritmul nictemeral al cortizolului ± ACTH sau al ACTH: probe la orele 9, 18 şi 24.
ii) Controlul *feed-back*: — inhibiţia ACTH cu dexametazonă;
— stimulare ACTH cu metopironă
iii) Controlul prin *stress*: — proba de toleranţă la insulină;
— proba la pirogeni;
— proba la lizin-vasopresină

B) Pentru capacitatea funcţională a CSR:
i) Proba la metopironă
ii) Proba de stimulare cu ACTH

Scanned with OKEN Scanner

Pregătirea pacientului. Nu este obligatoriu ca prelevarea probelor de sînge să se facă pe nemîncate. Nivelul plasmatic al ACTH nu este mult influenţat nici de poziţia bolnavului şi nici de o activitate fizică obişnuită. Se întrerupe orice medicaţie cu adresă centrală: antiepileptice, antidepresive,

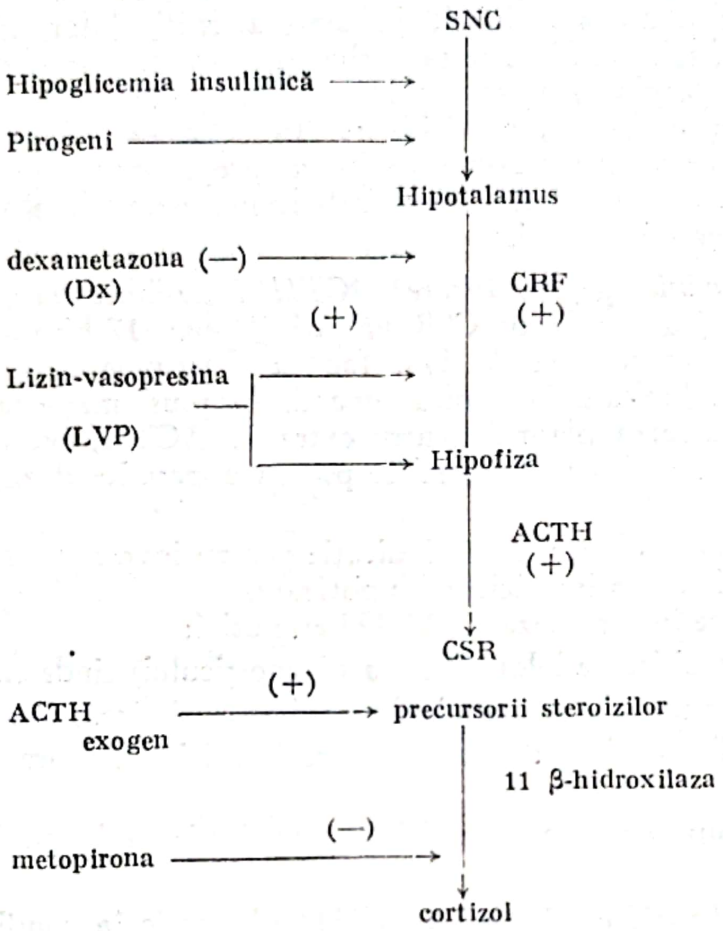


Fig. II.2.13. Locul probabil de acţiune al substanţelor folosite în probele de investigaţie a funcţiei hipotalamus-hipofiză-CSR.

sedative etc., şi de asemenea tratamentul cu corticoizi. Sînt evitate stări patologice ca icterul, febra, stările depresive.

Ţinînd seama de variaţiile nictemerale ale ACTH, orariul prelevărilor trebuie respectat.

Determinări în condiţii bazale. Sîngele este prelevat între 9 şi 10 dimineaţa: concentraţia ACTH este de 10—80 pg ml.

Ritm nictemeral: sîngele este recoltat la orele 9, 18 şi 24. Valorile maxime, la normali, sînt dimineaţa şi cele minime (sub 10 pg/ml) la miezul nopţii; cortizolul (metoda fluorimetrică) la ora 9 are valori de 8—27 μg/100 ml şi la ora 24 este sub 8 μg/100 ml. Peste ritmul diurn de bază se suprapun descărcări multiple, de scurtă durată (67).

În sindromul Cushing, valorile ACTH şi ale cortizolului pot fi normale la ora 9 dimineaţa, dar rămîn nemodificate în restul zilei.

Diferenţierea între sindromul Cushing prin ACTH ectopic şi boala Cushing se poate face numai în cazul în care valoarea bazală a ACTH la 2—3 determinări succesive trece de 200 pg/ml, ceea ce sugerează o secreţie

Scanned with OKEN Scanner

ectopică a ACTH, pe cînd în hiperplazia CSR de origine hipofizară, valoarea ACTH este la limita superioară a normalului (fig. II.2.14).

Probe de inhibiție a ACTH cu dexametazonă sînt folosite pentru investigarea bolnavilor cu hipersecreție CSR.

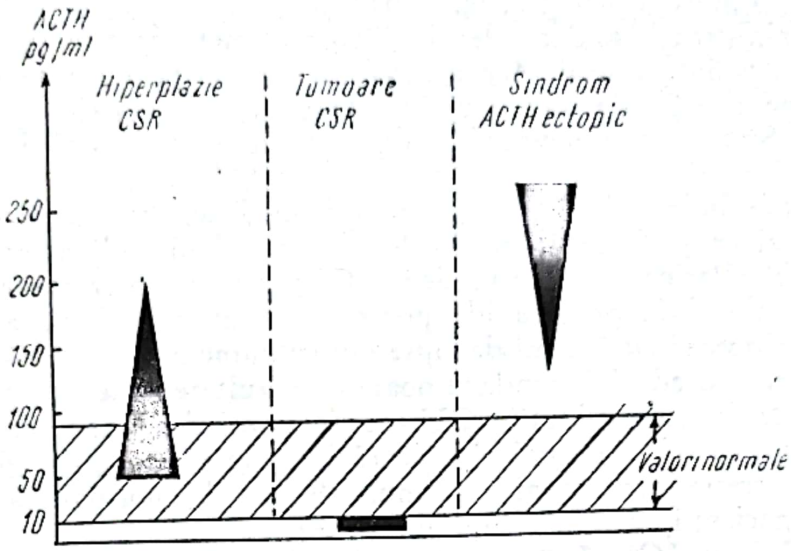


Fig. II.2.14. Concentrația ACTH plasmatic în boala Cushing (hiperplazia CSR de origine hipofizară), în tumori CSR (adenom, carcinom) și în sindromul Cushing prin ACTH ectopic. Zona haşurată reprezintă limitele valorilor matinale ale ACTH la normali.

Dexametazona (Dx) este un glucocorticoid de sinteză activ, care poate suprima secreția ACTH, dar care nu interferează în dozările de rutină ale cortizolului plasmatic sau ale steroizilor urinari.

— *Proba scurtă de inhibiție cu Dx.* Se administrează o singură doză de 1,5 mg Dx, *per os*, între orele 23 și 24; în ziua următoare, se prelevează o probă de sînge pentru dozarea cortizolului. Proba este utilă pentru *screening* la pacienți ambulatori.

Rezultate: dacă cortizolul plasmatic nu scade sub 7 μg/100 ml la ora 9 dimineața la un pacient nestresat, medicul poate suspecta un sindrom Cushing, și va recurge la probe mai complexe pentru clarificare.

— *Proba de inhibiție prelungită cu doză mică de Dx.* Se administrează *per os* 8 prize a 0,5 mg Dx la intervale de 6 ore, timp de 48 de ore, de exemplu la orele 9, 15, 21 și 3. Se recoltează sînge la ora 9 în prima, a doua și a treia zi și de două ori urina pe cîte 24 de ore.

Rezultat: la normali nestresați, secreția de ACTH și de cortizol încetează complet.

— *Proba de inhibiție prelungită cu doză mare de Dx.* Diagnosticul diferențial între sindromul Cushing prin ACTH ectopic și boala Cushing se stabilește cu ajutorul probei la doză mare de Dx, măsurînd cortizolul întrucît valorile ACTH pot rămîne crescute în ambele cazuri.

Se administrează timp de 48 de ore, la fiecare 6 ore cîte 2 mg Dx *per os*, în 8 prize. Sîngele și urina se recoltează ca în proba prelungită cu doză mică.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultat: dacă corticosteroizii plasmatici sau urinari scad cu 50%, se exclude diagnosticul de sindrom ACTH ectopic, hiperfuncţia CSR este mai curînd de origine hipofizară.

Proba de stimulare a ACTH cu metopironă. Metopirona sau metirapona este un anticortizolic de sinteză care acţionează prin inhibiţii enzimatice la nivelul 11 β-hidroxilazei (fig. II. 2.13).

Se administrează 6 doze de cîte 750 mg metopironă (sau 10 mg/kilocorp), *per os*, la intervale de 4 ore începînd de la ora 9. Se colectează urina de trei ori pe cîte 24 de ore: o zi înainte de probă, în ziua probei şi o zi după probă. Sîngele se prelevează la orele 9: în preziua probei, în timpul şi după probă.

Precauţii: bolnavul să nu primească medicamente care scad ACTH (glucocorticoizi exogeni) sau care accelerează metabolismul metopironei (difenil-hidantoină). Pacienţii cu insuficienţă CSR pot să prezinte vărsături sau hipotensiune; absorbţia prea rapidă poate produce ameţeli, de aceea metopirona se administrează cu 200 ml de lapte sau cu alimente.

Scurtarea procedeului standard poate da rezultate false.

Rezultat: la normali, 17—OH corticosteroizii urinari cresc multiplicativ iar la pacienţii cu rezervă hipofizară limitată rămîn la nivelurile bazale.

ACTH creşte procentual sau multiplicativ la normali, rămînînd nemodificat la pacienţii cu insuficienţă hipofizară.

e) *ACTH în LCR.* La normali, transferul ACTH din plasmă în LCR este minim, deoarece fluctuaţiile majore ale ACTH plasmatic nu se reflectă şi în concentraţia sa în LCR (68).

f) *ACTH placentar.* Creşterea lentă dar progresivă a ACTH în cursul sarcinii, asociată cu creşterea cortizolului liber rezistentă la supresia cu Dx spre sfîrşitul gestaţiei sugerează o sursă extrahipofizară a ACTH care nu se supune controlului fiziologic normal prin mecanisme *feed-back.* De altfel, s-a observat că extractele de placentă umană conţin cantităţi considerabile de ACTH imuno şi bioactiv (63).

g) *Anticorpii anti-ACTH.* Folosind ^{125}I-ACTH şi o tehnică de separare pot fi detectaţi anticorpii anti-ACTH care apar în serul bolnavilor trataţi cu doze repetate de ACTH (61, 69, 70).

2.4. GONADOTROFINELE HIPOFIZARE: HORMONUL LUTEINIZANT (LH) ŞI HORMONUL FOLICULOSTIMULANT (FSH)

2.4.1. INTRODUCERE

Gonadotrofinele hipofizare determină funcţia ovariană şi cea testiculară. Secreţia lor se află sub dependenţa hipotalamusului şi este reglată prin mecanisme de tip *feed-back.*

a) *Locul de sinteză.* Hormonul luteinizant (LH) şi hormonul foliculostimulant (FSH) sînt secretaţi de celulele gonadotrope ale hipofizei anterioare. Rezerva hipofizară la femeia adultă este de aproximativ 700 UI LH şi 200 UI FSH, ceea ce reprezintă un conţinut cu numai un ordin de mărime mai mare decît conţinutul total din plasmă. Acest raport sugerează că secreţia gonadotrofinelor este un proces activ şi continuu. Conţinutul hipofizar creşte de aproape trei ori la femeia la climacteriu. La bărbatul adult, rezerva hipofizară nu diferă mult de cea observată la femeia cu ciclu menstrual.

Scanned with OKEN Scanner

LH şi FSH dispar din plasmă prin mecanisme complexe, cu semiviaţa de 30—60 minute (HCG are $T^1/_2$ de peste 10 ore). Excreţia urinară a FSH este de aproximativ 36%, pe cînd cea a LH este sub 5%. Rata producţiei LH la femeia normală, în perioadele pre- şi postovulatorii, este de aproximativ 10—75 UI/zi şi 35—170 UI/24 ore în timpul ovulaţiei. La femeia în postmenopauză producţia LH este de 50—500 UI/zi. Ţinînd seama de conţinutul redus de LH în hipofiză, reiese că la fiecare 12—24 de ore are loc *turnover*-ul complet al gonadotrofinei stocate, ceea ce arată iarăşi că sinteza hipofizară a gonadotrofinelor este un proces activ (78).

b) *Natura chimică.* LH şi FSH uman, gonadotrofina corionică umană (HCG) şi TSH sînt hormoni glicoproteici cu structuri primare similare. Molecula lor este alcătuită din două subunităţi α şi β. Subunitatea α este comună moleculei celor patru hormoni, de aceea anticorpii faţă de un hormon dau reacţii încrucişate cu ceilalţi trei hormoni.

Molecula de LH uman (h-LH) are GM de 26 000 şi conţine 16% hidraţi de carbon. Se disociază în cele două glicopeptide (subunităţi) legate necovalent, prin expunerea la concentraţii mari de uree, de guanidină hidroclorică sau prin expunere la pH acid. A fost stabilită secvenţa completă a aminoacizilor în subunităţile α şi β.

h-FSH are GM de aproximativ 28 000 (27 270) din care 18% reprezintă hidraţi de carbon (71, 72). Molecula de h-FSH se disociază în cele două subunităţi inactive, α şi β, prin tratare cu uree 8M la pH=7,5 sau cu acid propionic 1M (73, 74, 75). Dacă agentul de disociere este îndepărtat, activitatea se restabileşte progresiv (dar nu complet), prin incubare prelungită la 37—40°C (76). A fost stabilită secvenţa aminoacizilor în cele două subunităţi ale h-FSH (71, 72); subunitatea α este identică cu cea a HLH

c) *Funcţia.* La bărbat, LH are ca receptor principal (sau unic) celulele Leydig şi fibroblaştii ţesutului interstiţial, care se pot transforma, prin diferenţiere, în celule Leydig. LH stimulează astfel secreţia androgenilor care este necesară pentru dezvoltarea caracterelor sexuale secundare şi pentru spermatogeneză.

FSH este necesar pentru spermatogeneză, în special pentru diviziunea spermatogoniilor. Se pare că şi testosteronul este necesar pentru meioza spermatocitelor şi pentru diferenţierea ulterioară a spermatidelor ca şi pentru maturarea spermatozoizilor.

La femeie, pînă în prezent nu se poate stabili o corespondenţă între un hormon gonadotrop şi un hormon ovarian. Schema potrivit căreia estrogenii depind de FSH şi progesteronul de LH este discutabilă. Se ştie doar că LH şi FSH acţionează sinergic pentru realizarea sintezei şi a eliberării cantităţilor fiziologice de estrogeni. Cu privire la mecanismele fiziologice care declanşează ovulaţia, se ştie numai că aceasta depinde de un „pisc" de LH, dar nu se cunosc mecanismele prin care are loc această descărcare hormonală (77). Se crede că estradiolul descarcă LH printr-o acţiune de *feed-back* pozitiv.

d) *Reglare şi control.* Reglarea secreţiei de FSH şi LH este asigurată de hormonii hipofizotropi şi prin *feed-back*-ul inhibitor realizat prin hormonii

Scanned with OKEN Scanner

sexuali (fig. II.2.15). Decapeptidul LH/FSH-RF sau Gn-Rh stimulează eliberarea şi a LH şi a FSH, deşi sînt unele date sugestive pentru existenţa a două gonadostimuline sau pentru mecanisme distincte de antrenare a stimulului hipotalamic, probabil prin intermediul hormonilor steroizi sexuali (78).

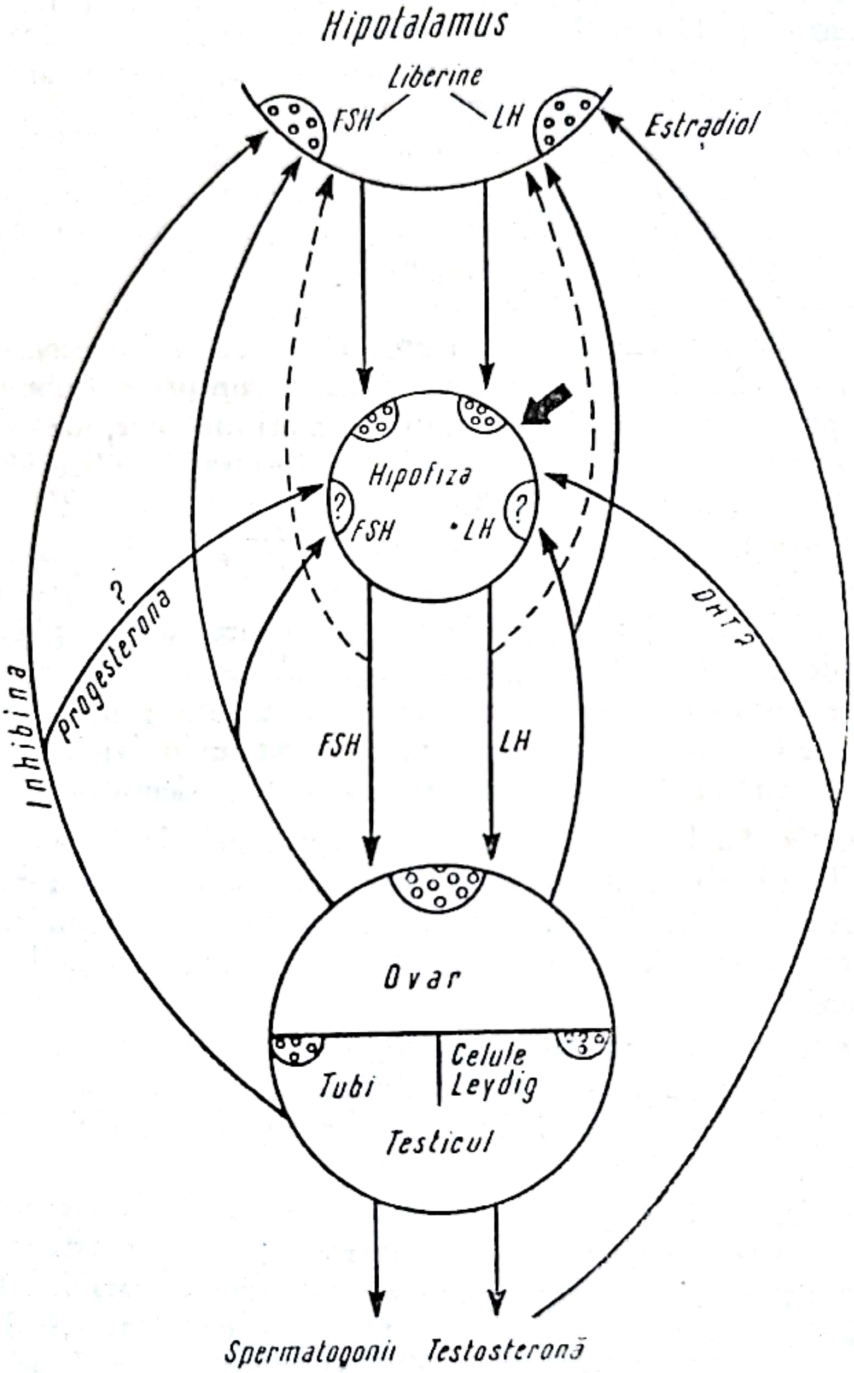


Fig. II.2.15. Reprezentare schematică a reglării şi controlului secreţiei LH şi FSH.

Fiziologie. La bărbaţi, testosteronul, fie direct fie după conversia la estradiol, reglează secreţia LH la nivel hipotalamic şi hipofizar dar inhibiţia este mai puţin accentuată decît cea a hormonilor ovarieni. Secreţia FSH hipofizar este reglată de o substanţă nesteroidă — „inhibina" — sintetizată în

Scanned with OKEN Scanner

tubii seminiferi în timpul spermatogenezei, care inhibă răspunsul FSH hipofizar la LH/FSH-RF.

La femei, estradiolul și progesteronul au efecte complexe: și inhibiție, și stimulare la nivelul hipotalamusului și hipofizei.

La ambele sexe, hormonii gonadici exercită o inhibiție tonică asupra gonadotrofinelor. Dacă acest *feed-back* lipsește sau este redus, ca de exemplu în hipogonadismul periferic, crește concentrația LH și FSH în circulație.

Patologie. Cei doi poli ai perturbărilor hipotalamo-hipofizo-gonadice sînt hipofuncția și hiperfuncția acestui releu.

Hipofuncția. Indiferent de cauze, hipofuncția se manifestă prin insuficiența caracterelor sexuale secundare și a funcției sexuale ca urmare a secreției reduse a steroizilor sexuali gonadici. La bărbați, testosteronul scade sub nivelul normal, iar la femei scade estradiolul și progesteronul.

Insuficiența gonadică poate fi primară — prin leziune gonadică — deci insuficiență periferică, sau secundară — prin leziuni hipotalamice, hipofizare sau hipotalamo-hipofizare —deci insuficiență centrală.

La *femei*, insuficiența gonadică *primară* (tabelul II.2.5) poate fi datorită unor anomalii cromozomiale ca în sindromul Turner, sau este rezultatul unor anomalii de dezvoltare a gonadelor, ca în disgenezia gonadică. La menopauză există de asemenea insuficiență ovariană cu gonadotrofine crescute. Castrarea prin iradiere și ovariectomia terapeutică sînt alte cauze ale creșterii gonadotrofinelor.

Tabelul II.2.5.

Amenoree secundare
(referințele 79, 80)

Tipul de amenoree	Gonadotrofine		Proba
	LH	FSH	GN–RH
Amenoree hipergonadotrope			
Insuficiența ovariană primară (periferică):			
a) Congenitală			
— agenezie ovariană	↗	↗	
— disgenezie gonadică			
a) Congenitală	↗	↗	
— menopauză precoce			
— castrare :— chirurgicală	↗	↗	
— iradiere			
— distrugerea ovarului prin infecții (rar)	↗	↗	
Amenoree eu-sau hipogonadotrope			
Insuficiența ovariană secundară (centrală):			
Disfuncție hipotalamo-hipofizară			
a) Congenitală — deficit de gonadotropi	↙	↙	(—)
b) Cîștigată			
— organică (leziuni ale SNC), ale hipofizei	↙	↙	(+)
— funcțională de exemplu:	↙	↙	(±)
psihogenă			
alimentară	↙	↙	
boli intercurente			
boli endocrine extragenitale			
farmacologică (tranchilizante, anticoncepționale)			

↗ = crește; ↙ = scade; ↗ = inconstant crescut; ↙ = inconstant scăzut; (—) = absența răspunsului; (+) = răspuns prezent; (±) = răspuns la limită sau neconcludent.

Scanned with OKEN Scanner

La *bărbaţi*, cauzele insuficienţei gonadice primare sînt orhita, hidrocelul şi varicocelul, anomaliile cromozomiale ca în sindromul Klinefelter, criptorhidia, anorhia etc. (tabelul II.2.6 şi fig. II.2.16).

Tabelul II.2.6.

Clasificarea hipogonadismului masculin (referinţele 81, 82)

Forma clinică sau etiopatogenică	Gonadotrofine		Stimulare
	LH	FSH	
Sindroame eugonadotrope			
Insuficienţa frustă a tubilor seminiferi la adult	→	→	
Sindroame hipergonadotrope			
Anomalii cromozomiale			
Sindrom Klinefelter clasic şi variante	↗	↗	
Mozaicism cromozomial			
Sindrom „xyy"			
Sindrom de celulă Sertoli	→	→	
Sindrom Reifenstein	↗	↗	
Sindrom Turner masculin (Ulrich-Turner)	↗	↗	
Sindrom de castrare funcţională prepubertară	↗	↗	
Insuficienţa gravă a tubilor seminiferi	→	↗	
Orhita	↗	↗	
Insuficienţa celulelor Leydig la adult (climacterium masculin)	↗	↗	
Sindroame hipogonadotrope			
Eunuchismul hipogonadotrop	↙	↙	
— formă clasică	↙	→	GN-RH: LH(+)
— variante: eunuchism fertil	↙	↙	HCG:LH(+)
(deficit disociat de LH)	↙	↙	Clomifen (—)
Deficit de gonadotropi + STH	↙	↙	
Pubertate întîrziată	↙	↙	HCG (+)
Panhipopituitarism:	↙	↙	
— prepubertar (nanismul hipofizar)	↙	↙	
— postpubertar selectiv şi panhipo	↙	↙	Gn-RH (—)
Sindroame cu deficit izolat de gonadotrofine			
Sindromul de Morsier şi Kallman (displazia olfacto-genitală de origine hipotalamică)	↙	↙	Gn-RH (+) Clomifen(—)
Sindromul Lawrence-Moon-Bardet-Biedle	↙	↙	
Sindromul Prader, Labhart şi Willi (defect de maturare hipotalamo-hipofizară)	↙	↙	Gn-RH (+) Clomifen (±)
Sindromul Babinski-Frölich	↙	↙	

Legenda:

→ = normal; ↗ = crescut; ↙ scăzut; ↗ = inconstant crescut; ↙ = inconstant scăzut; (+) = răspuns prezent; (—) = răspuns absent; (±) = se pozitivează după creşterea dozei.

Insuficienţa gonadică secundară, rezultată din deficitul secreţiei liberinelor hipotalamice şi al gonadotrofinelor hipofizare include cazurile de pubertate întîrziată, anumite boli ereditare ca sindromul Kallman sau cazuri cu tumori hipotalamice sau hipofizare. Cînd tumoarea este localizată în hipo-

Scanned with OKEN Scanner

fiză, sînt afectate și alte funcții ale hipofizei. În insuficiența gonadică secundară, de origine hipofizară, concentrația LH și FSH în sînge este redusă iar răspunsul la Gn-RH este diminuat sau la limita inferioară a normalului.

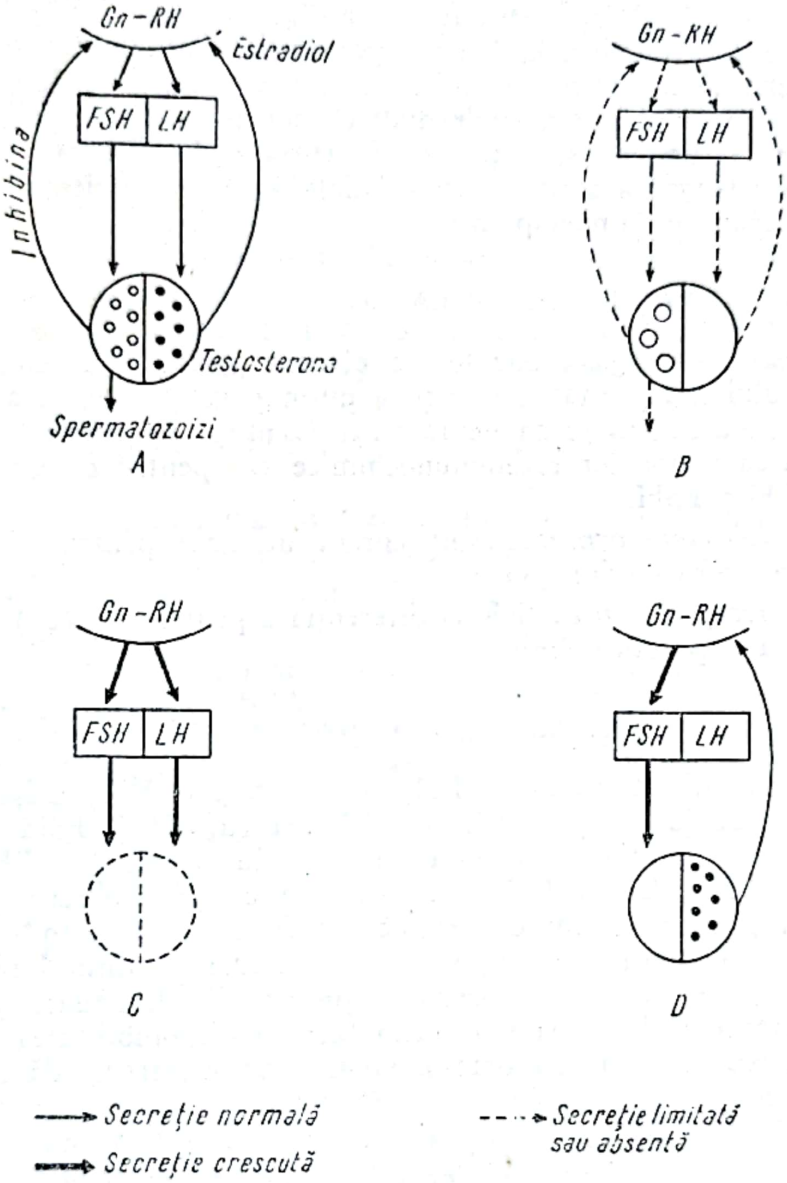


Fig. II.2.16. Sistemul hipotalamus-hipofiză-gonade la bărbați normali și în diferite forme de hipogonadism (referința 79 modificat):

A — normali adulți, *B* — Hipogonadism hipogonadotrop (eunuchism). *C* — Hipogonadism hipergonadotrop (castrare funcțională prepubertară). *D* — Hipogonadism hipergonadotrop disociat (sindromul de insuficiență a tubilor seminiferi).

La ambele sexe pot apare anomalii ale producției de celule germinale, cu păstrarea caracterelor sexuale secundare, deoarece funcția hormonală a gonadelor poate rămîne relativ intactă. De exemplu, oligospermia și azoospermia se pot datori unui blocaj mecanic, caz în care nivelul hormonal este normal. În cazurile cu leziuni ale tubilor seminiferi, nivelul LH poate fi

Scanned with OKEN Scanner

normal; crește însă FSH proporțional cu gradul leziunii tubulare, deoarece prin scăderea masei tubilor scade și sinteza „inhibinei" (factorul de control specific al secreției FSH). La femei, sînt greu de diagnosticat unele tulburări ale ciclului ovarian sau ale funcției corpului galben.

În ceea ce privește aplicarea termenilor „primar" și „secundar" în cazurile de insuficiență gonadică la femei, apar unele confuzii. De exemplu, prin amenoree primară se înțelege absența ciclului menstrual la femei care n-au avut niciodată menstra, ca în sindromul Turner și în insuficiența hipofizară. Prin amenoree secundară se înțelege dispariția ciclului menstrual după un interval în care femeia a avut cicluri normale, ca în insuficiența ovariană din sindromul Sheehan sau la menopauză.

2.4.2. METODE DE CANTIFICARE A LH ȘI FSH

a) *Metodele biologice*, bazate pe efectele gonadotrofinelor la nivelul uterului, ovarului sau prostatei, sînt prea puțin sensibile pentru a detecta LH și FSH în plasmă sau în urina neprelucrată. Totuși, ele continuă să fie utile pentru validarea metodelor radioimunochimice sau pentru caracterizarea preparatelor de LH și FSH.

b) *Metodele imunochimice* sînt curent utilizate pentru diagnosticul și pentru supravegherea sarcinii (83).

c) *Radioreceptoranaliza* (RRA) diferențiată pentru LH (84) și FSH (85) nu a intrat încă în practica clinică.

2.4.3. METODE RIA PENTRU LH ȘI FSH

Primele metode RIA pentru LH au folosit reacția încrucișată a serului anti-HCG cu LH (86, 87). Sistemele RIA pentru LH și FSH sînt sisteme omologe, deoarece reacția încrucișată de exemplu cu ser anti-LH ovin este destul de variabilă. Pentru LH se folosesc în continuare seruri anti-HCG, iar standardul și trasorul sînt de origine hipofizară umană. În sistemul RIA FSH toți reactivii au ca sursă hipofiza umană. Dar conținutul unei hipofize umane în LH și FSH este foarte redus și procedurile de izolare, purificare și testare sînt extrem de laborioase. Aceasta face ca disponibilitatea materialelor necesare să fie redusă, ceea ce a determinat O.M.S. să întreprindă unele acțiuni pentru a veni în ajutorul celor interesați (88, 89).

a) *Imunogenul:* HCG sau h-LH și HMG sau H-FSH sînt bune imunogene. Schema clasică de imunizare pe cale intraperitoneală și intramusculară consumă mult antigen de ordinul a 1,0—1,5 mg pentru un animal. Pentru metoda intradermică în multiple locuri sînt suficiente doze de 20—100 μg (60, 90, 91, 92, 93).

b) *Antiserul* se obține prin imunizări repetate la iepure. Apariția anticorpilor este testată prin reacția de precipitare prin dublă difuziune, iar titrul este apreciat, în mare, prin reacția de precipitare inelară (90, 91).

Serurile anti-LH și anti-FSH sînt contaminate cu anticorpi anti-proteine serice și tisulare, care pot fi îndepărtați prin procedeele de adsorbție în fază lichidă. Acestea au inconvenientul că antiserul este contaminat apoi cu o cantitate considerabilă de proteine din care numai o mică parte reprezintă antigenul destinat procesului de neutralizare a anticorpilor contaminanți. De aceea,

Scanned with OKEN Scanner

se recurge la imunosorbenţi solizi pentru fiecare contaminant suspectat (91). Această metodă este adecvată în special pentru îndepărtarea anticorpilor anti-LH din serul anti-FSH şi are avantajul că îndepărtează şi anticorpii precipitanţi şi pe cei care formează complexe antigen-anticorp solubile (91).

Specificitatea antiserului faţă de ceilalţi hormoni glicoproteici structural înrudiţi se face în sistem RIA folosind concentraţii progresiv crescătoare de hormoni (92, 93).

Titrul antiserului, care reflectă concentraţia anticorpului (nu şi afinitatea pentru antigen) este estimat tot în sistem RIA, folosind diluţii progresiv crescătoare de antiser în prezenţa hormonului omolog marcat, în absenţa hormonului rece.

Seruri anti-HLH şi anti-HFSH testate şi caracterizate pot fi obţinute de la NIH-NIAMDD — S.U.A.

c) *Hormonul marcat.* H-LH (sau HCG) şi H-FSH sînt ioduraţi prin metoda cu cloramină-T (30, 90, 91) sau prin metoda cu lactoperoxidază (91).

Pentru iodurare sînt folosiţi hormoni foarte purificaţi, de exemplu H-LH şi H-FSH distribuiţi de NIH-NIAMDD sau HCG livrat comercial de Organon Inc. (60, 90, 91).

Purificarea hormonului marcat se face prin cromatografierea amestecului de marcare pe coloană de Sephadex G-50 fin sau G-100 fin (90, 91).

Hormonul marcat conservat prin congelare sau liofilizare rămîne stabil 3—6 săptămîni.

d) *Gonadotrofina standard.* Preparate standard testate şi caracterizate pot fi obţinute de la NIH-NIAMDD — National Pituitary Agency — S.U.A. distribuit sub denumirea de LER-907. Acesta este calibrat faţă de 2-IRP-HMG distribuit de National Institute for Medical Research, Division of Biological Standard — Anglia. Ambele preparate (LER-907 şi IRP-HMG) sînt utilizabile şi în sistem RIA-LH şi în sistem RIA-FSH. Pentru a economisi standardele internaţionale (2-IRP-HMG şi LER-907), se pot obţine standarde locale calibrate faţă de cele internaţionale prin selecţionarea unor cantităţi suficiente de plasmă cu conţinut adecvat de LH şi FSH.

e) *Probele biologice.* LH şi FSH se pot măsura în ser (sau plasmă), în LCR şi în urină.

Pregătirea pacientului. Concentraţiile LH şi FSH nu sînt influenţate de ingestia alimentară, de poziţie, *stress* sau activitate fizică. Probele de sînge pot fi recoltate la orice oră, deoarece secreţia gonadotrofinelor nu prezintă fluctuaţii circadiene. Concentraţiile bazale ale LH prezintă fluctuaţii pulsatile importante la intervale de cîteva ore (94), de aceea determinarea „unicat" a LH are o valoare mai mică decît aceea a FSH.

Probele de sînge pot fi colectate în eprubete din sticlă sau din material plastic. După separare, serul sau plasma pot fi păstrate pînă la 24 de ore la 4°C înainte de a fi trimise la laborator (40).

Urmărirea valorilor circulante ale LH şi FSH la *femei* este adaptată scopului, folosindu-se:

— pentru determinări unicat în climacteriu şi în unele cazuri patologice (amenoree);

— determinări *seriate*, cu o frecvenţă variabilă de la 1 la 6 zile, în cursul unuia sau mai multor cicluri menstruale;

Scanned with OKEN Scanner

— determinări unicat urmate de *probe dinamice*, de exemplu la Gn-RH sau la clomifen.

f) *Incubarea reactivilor* se face cu tampon fosfat 0,04—0,05 M, la pH = 7,4—7,5 albuminat. Incubarea se face la rece sau la temperatura ambiantă, în funcție de stabilitatea reactivilor. Durata incubării și faza de pre-

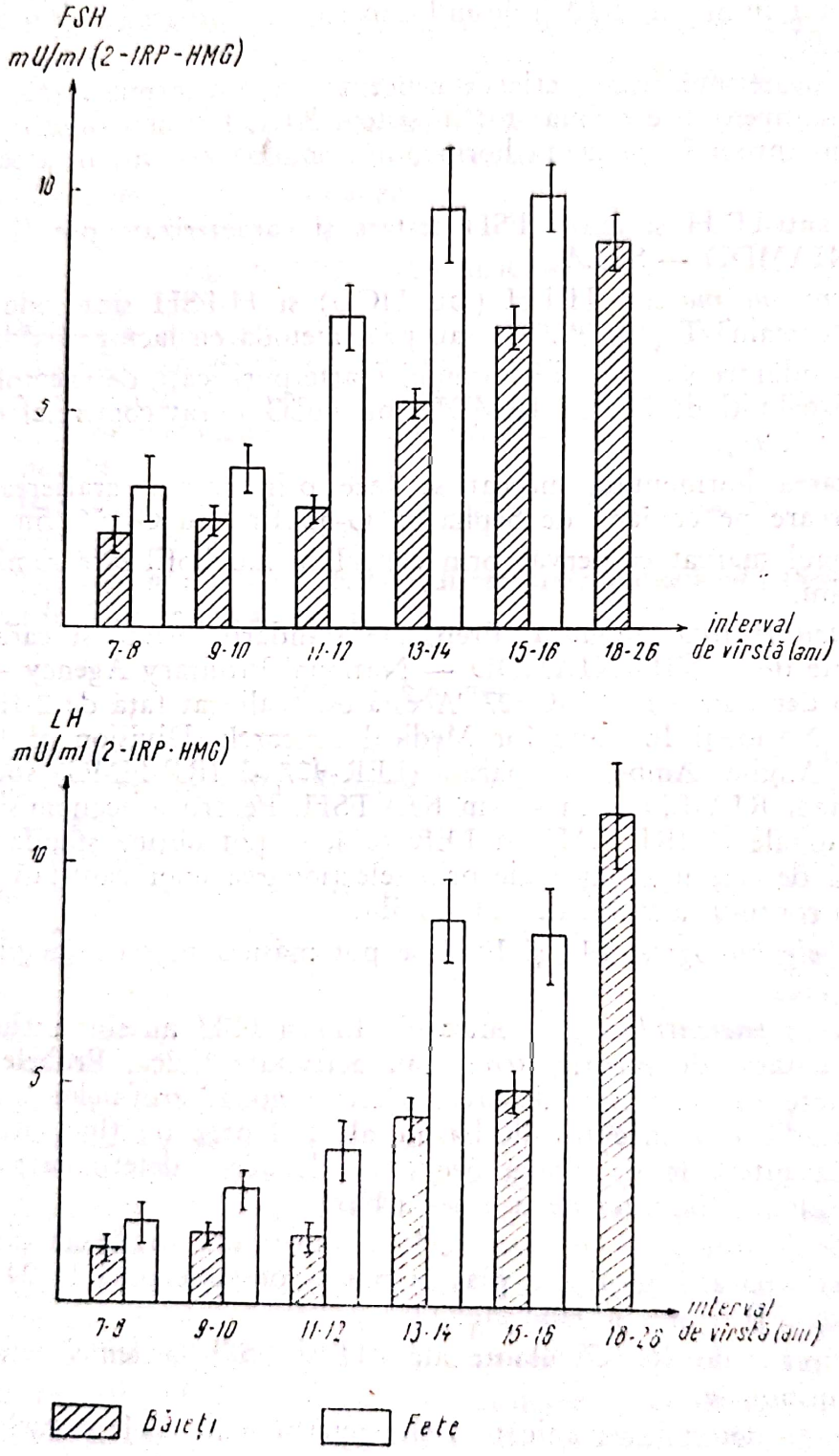


Fig. II.2.17. Nivelul FSH și LH la băieți și fete între 7 și 16 ani (media și eroarea standard a mediei) (după 97).

Scanned with OKEN Scanner

incubare se selecţionează în funcţie de afinitatea antiserului şi de sensibilitatea dorită.

g) *Tehnica de separare.* Tehnica cu dublu anticorp este folosită în majoritatea sistemelor RIA pentru separarea complexelor Ag-Ac de hormonul marcat liber. Există şi sisteme RIA în fază solidă, cu adsorbţia antigenului pe diferiţi polimeri.

h) *Specificitatea* sistemelor RIA pentru H-LH şi H-FSH este o latură dificilă şi este strîns dependentă de specificitatea antiserului şi de puritatea hormonului marcat. Interferenţele de temut sînt cele ale LH (respectiv FSH) şi ale TSH. În cursul sarcinii, concentraţiile mari de HCG interferează copios în sistem.

i) *Sensibilitatea.* Majoritatea sistemelor RIA pentru LH şi FSH reuşesc să detecteze concentraţii de 0,5—1,0 mU/ml în termeni de 2-IRP-HMG.

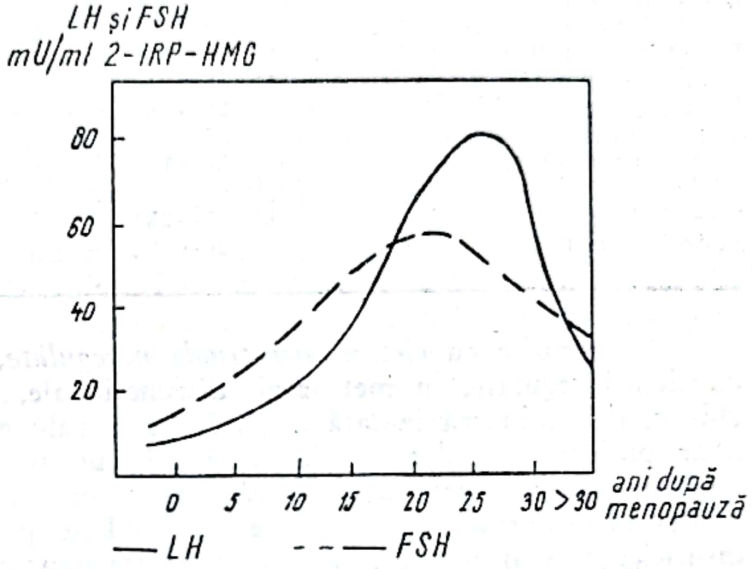


Fig. II.2.18. Concentraţia serică a LH şi FSH la femei în postmenopauză.

2.4.4. APLICAŢII CLINICE ŞI REZULTATE

a) *Normali*

La ambele sexe, determinările unicat sînt obligatorii pentru stabilirea concentraţiilor normale în raport cu vîrsta (95, 96, 97) (fig. II.2.17 şi II.2.18). La femei, sînt necesare determinările seriate în cursul ciclului menstrual (fig. II.2.19 şi tabelul II.2.7).

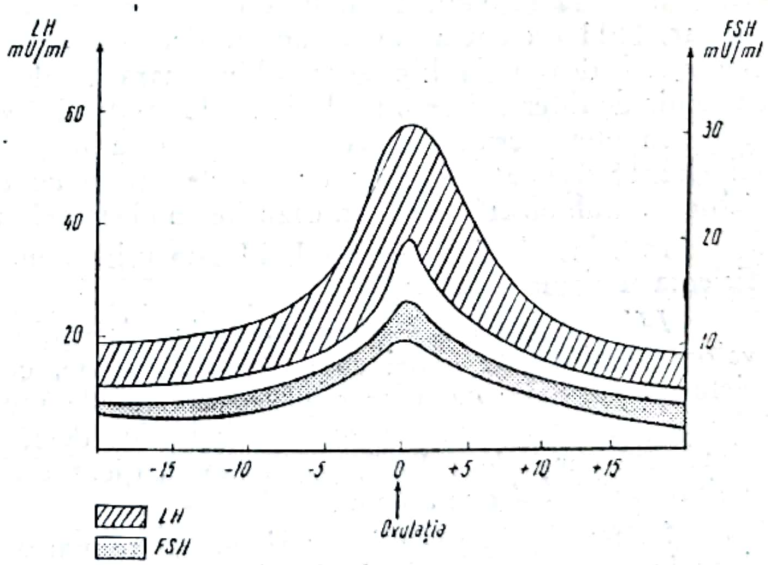


Fig. II.2.19. Concentraţia LH şi FSH în serul femeilor cu cicluri menstruale normale (LH; FSH).

b) *Patologie*

Determinări unicat ale FSH la femei

În *amenoreea primară sau secundară*, o valoare crescută a *FSH* este un indicator de insuficienţă ovariană. O valoare scăzută sau normală a FSH sugerează o disfuncţie hipotalamohipofizară şi de aceea este necesară o probă dinamică de stimulare.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.2.7.

Concentraţia LH şi FSH în ser şi în urina persoanelor normale (valori orientative)

Grup	LH (2-IRP-HMG)		FSH (2-IRP-HMG)	
	mU/ml ser	U/24 ore urina	mU/ml ser	U/24 ore urina
Copii (băieţi şi fete) impuberi	4—8	0—23		2—5
Femei (sub 40 ani)				
Faza foliculară	5—25	5—70	2—20	2—20
Faza ovulatorie	25—70	35—170	15—30	15—30
Faza luteală	5—25	10—75	2—20	2—20
Post menopauză	50—100	50—500	50—120	
Bărbaţi				
20—50 de ani	5—25	5—50	3—5	5—10
peste 50 de ani	20—100		10—50	

În cazurile cu *cicluri menstruale neregulate*, în sterilitatea anovulatorie cu cicluri regulate, în metroragii disfuncţionale, în sindromul de ovar polichistic, determinarea izolată a FSH are o valoare limitată. În sindromul de ovar polichistic, valorile FSH rămîn la un nivel normal sau scăzut, spre deosebire de LH care prezintă descărcări neregulate (98). În prezenţa unor concentraţii normale sau scăzute de FSH se poate elimina diagnosticul de insuficienţă ovariană. La femeia în postmenopauză, FSH crescut arată integritatea funcţiei gonadotrope hipofizare.

Determinarea unicat a FSH mai are valoare în cazurile cu leziuni ale hipofizei sau după hipofizectomie la femei.

FSH la bărbaţi. În pubertatea întîrziată şi în hipogonadismul postpubertar, FSH crescut arată leziune testiculară primară. FSH normal sau scăzut sugerează disfuncţie hipotalamo-hipofizară şi de aceea este necesar un test dinamic de diferenţiere între leziunea hipotalamică şi cea hipofizară.

În oligospermia şi azoospermia cu caractere sexuale secundare normale, nivelul FSH poate fi crescut în acele cazuri cu disfuncţia tubilor seminiferi (absenţa „inhibinei"), nu şi în cazurile cu obstrucţia tubilor.

În criptorhidie, dozarea FSH este utilă numai cînd se asociază cu insuficienţa testiculară primară.

LH la femei. În *preclimacteriu*, determinarea unicat de LH are o valoare limitată la femei cu cicluri neregulate, cu sterilitate anovulatorie cu cicluri neregulate, cu metroragii disfuncţionale sau cu sindrom de ovar polichistic. În sindromul de ovar polichistic, determinări ale LH o dată pe săptămînă timp de o lună, pot să evidenţieze creşteri în limite normale dar activitatea ciclică este absentă.

La femeile în *postclimacterium*, determinarea concentraţiei LH este utilă doar în cazurile cu leziuni hipofizare sau după hipofizectomie, deşi dozarea FSH poate fi un discriminant încă mai bun, nivelul său fiind mai constant.

LH la bărbaţi. În cazurile de pubertate întîrziată, concentraţia crescută a LH indică insuficienţă testiculară primară; concentraţii normale sau scăzute sugerează disfuncţii hipotalamo-hipofizare care necesită teste dinamice pentru localizarea deficitului.

Scanned with OKEN Scanner

Măsurarea concentrației LH are o valoare limitată la bolnavii cu oligospermie și azoospermie cu caractere sexuale secundare normale. Numai în cazurile de criptorhidie asociată cu insuficiență testiculară primară aprecierea concentrației serice a LH poate avea o valoare pentru clinician.

Probe dinamice

În stadiul actual, probele dinamice sînt utile mai ales în cercetare, valoarea lor diagnostică fiind destul de limitată (40).

Cînd concentrația LH și FSH în ser este crescută, ca în insuficiența gonadică primară (periferică), probele de stimulare a hipofizei nu au nici o valoare (40).

Probele dinamice de stimulare sînt indicate în disfuncția hipotalamo-hipofizară cu valori normale sau scăzute de LH și/sau de FSH, cu scopul de a evalua rezerva secretorie hipofizară, iar în hipofizectomia terapeutică sînt utile pentru a aprecia cantitatea de țesut hipofizar restant.

Proba de stimulare cu LH/FSH-RF se bazează pe acțiunea directă a acestui factor (hormon) asupra hipofizei. Se administrează i.v. doze de 25, 50, 100 sau 200 μg de LH/FSH-RF și se colectează probe de sînge la 0, 20 și 40, la 0, 30 și 60 sau la 0, 20, 40, 60 și 120 de minute. Obișnuit, se măsoară numai LH. La normali (femei și bărbați) în primele 40 de minute LH crește multiplicativ pînă la valori cu aproximativ un ordin de mărime mai crescut față de valoarea bazală (inițială) (fig. II.2.20). Proba este negativă (absența răspunsului) la bolnavi cu insuficiență hipofizară organică (fig. II.2.21).

La bolnavii cu diagnostic de disfuncție hipotalamo-hipofizară, distincția între leziunea hipotalamică și cea hipofizară este greu de făcut, întrucît la doza de 100—200 μg, țesutul hipofizar chiar lezat (tumori și alte procese patologice) răspunde prin eliberarea gonadotrofinelor. De aceea se recurge la doza minimală de 25 μg, după care, dacă răspunsul este pozitiv, se poate deduce că hipofiza este intactă și leziunea este în hipotalamus (99). O variantă alternativă este dozarea radioimunologică a LH/FSH-RF, dar tehnica nu a intrat încă în patrimoniul determinărilor de rutină.

Proba de stimulare cu substanțe antiestrogenice. Clomifenul sau Clomidul și Tamoxifenul sînt substanțe antiestrogenice (Clomifenul are și ușoară activitate estrogenică), care stimulează secreția LH și FSH (100). Se practică diferite variante ale schemei de administrare și prelevare a probelor biologice, în funcție de sex și de situația clinică.

La femei se administrează cîte 50 mg de două ori pe zi, timp de 5 zile, sau 2 mg/kilocorp/24 de ore (doza maximă este de 150 mg). Precauții: suprastimularea cu Clomifen la femei cu ovar polichistic poate fi dăunătoare.

La bărbați se administrează aceeași doză timp de 7—10 zile.

La ambele sexe, probele de sînge se recoltează zilnic înainte, în timpul și după probă, sau, în funcție de durata probei, în zilele 0, 3, 5, 7 și 10.

Rezultat. Răspunsul minim al LH la normali este o creștere de 30% față de valoarea bazală, iar al FSH de 20%. Dacă gonadotrofinele nu cresc, deși ele cresc după Gn-RH, atunci se poate conchide că defectul este în hipotalamus ca în cazurile de sindrom Kallmann (101). În unele cazuri de hipogonadism, după stimularea cu Clomid, concentrația gonadotrofinelor rămîne mai multe luni la limita superioară a normalului, ca și cînd agentul stimulator ar fi maturat receptorii hipotalamici corectînd astfel defectul hipotalamic, care a generat boala.

Scanned with OKEN Scanner

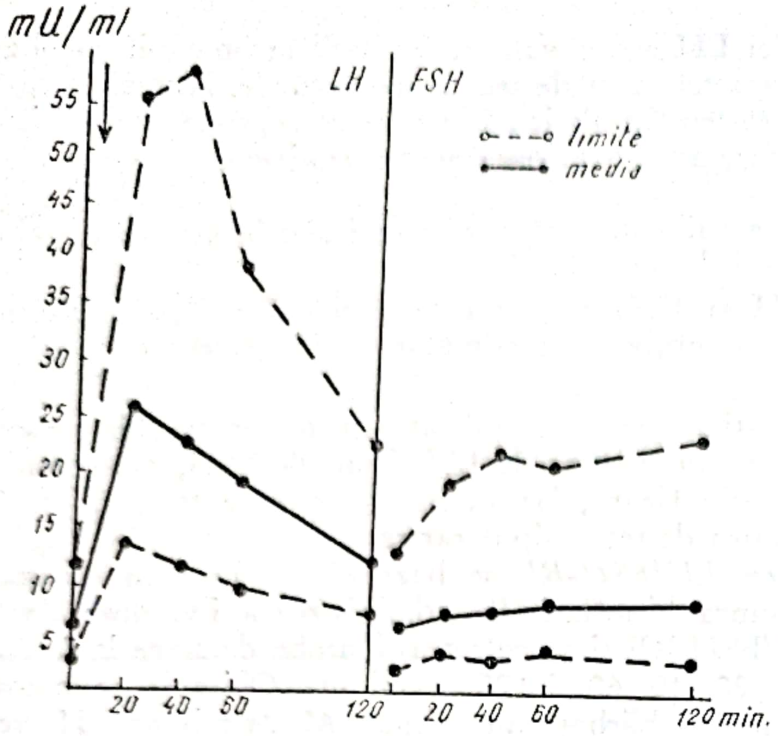
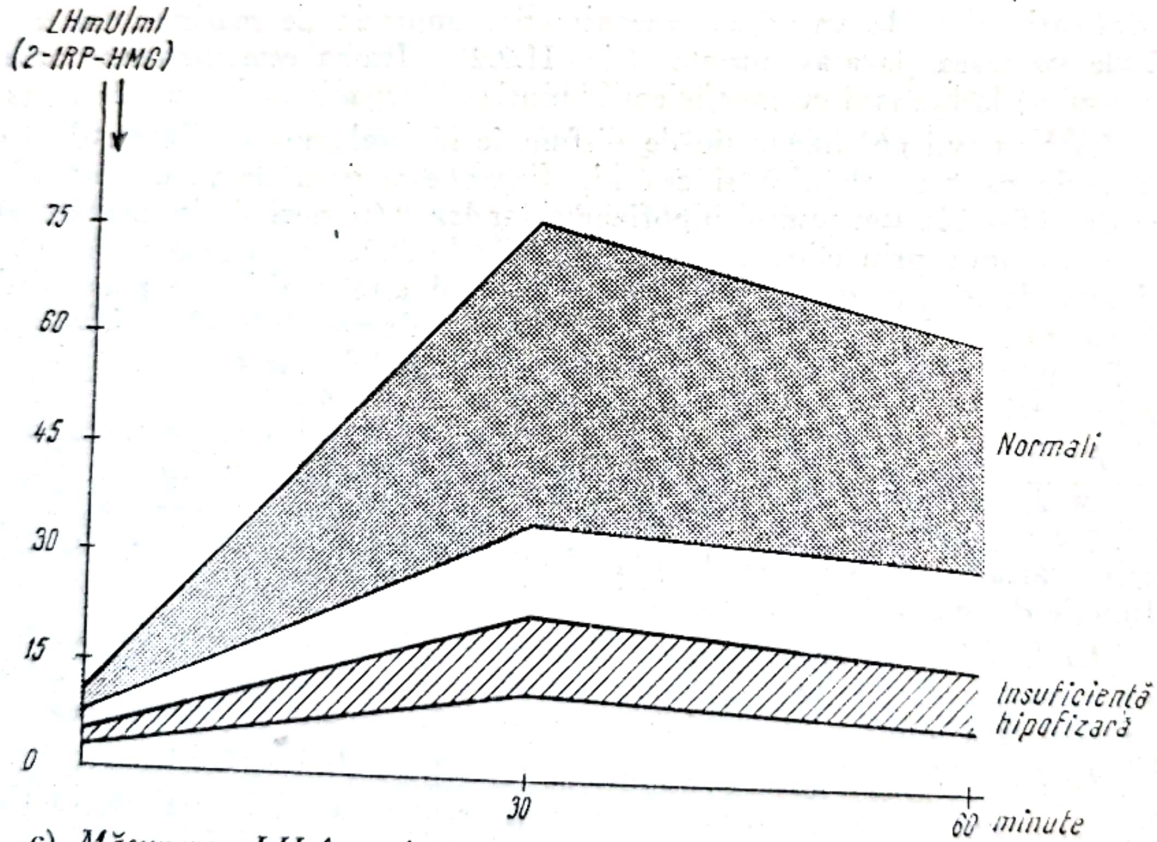


Fig. II.2.20. Concentrația LH și FSH după 200 μg i.v., de LH/FSH-RF la normali.

Fig. II.2.21. Eliberarea LH hipofizar după administrarea unei doze de 100 μg de LH/FSH-RF.



c) *Măsurarea LH în urină* este utilă pentru studiul tulburărilor de ovulație și al funcției de reproducere.

Pregătirea pacientei și a probei de urină. Nu sînt necesare pregătiri speciale. Cu o săptămînă înainte de probă se întrerupe tratamentul cu preparate de HCG (din cauza reacției încrucișate cu LH).

Se colectează urina din 24 de ore la care se adaugă un conservant, de exemplu 10 ml de acid boric 2%. Se notează volumul și se trimite la laborator un flacon de 25 ml. Pe buletinul de însoțire se notează datele uzuale și, în plus, volumul total al urinii, data ultimei menstre (cînd este cazul), trata-

Scanned with OKEN Scanner

mentul aplicat recent. Valori orientative ale LH în urină la copii, impuberi, la femei şi la bărbaţi adulţi sînt redate în tabelul II.2.7.

Sînt o serie de situaţii clinice, în care măsurarea LH în urina din 24 de ore este utilă.

La femei: în amenoree, se poate stabili dacă amenoreea primară sau secundară este datorită insuficienţei ovariene, în cazul cînd LH este crescut. În alte situaţii valoarea determinării este limitată: cicluri neregulate, infertilitate anovulatorie cu cicluri regulate, metroragii disfuncţionale, sindrom de ovar polichistic, etc. La femei în postclimacteriu măsurarea LH poate fi utilă pentru urmărirea bolnavelor cu leziuni hipofizare sau după hipofizectomie.

La bărbaţi: în pubertatea întîrziată eliminarea crescută a LH este un indicator de insuficienţă testiculară primară. Eliminarea normală sau scăzută atrage atenţia asupra unei eventuale disfuncţii hipotalamo-hipofizare, pentru precizarea căreia este necesară investigaţia dinamică a gonadotrofinelor. În criptorhidie, dozarea este utilă numai în cazurile în care există şi o insuficienţă testiculară. În oligospermia cu caractere sexuale secundare normale, analiza eliminării LH nu are valoare pentru clinician.

d) *Măsurarea LH şi FSH în lichidul cefalorahidian*

Datele asupra concentraţiei gonadotrofinelor în ser şi în LCR este considerată utilă în cazurile cu tumori hipofizare cu extensie supraselară, cu scopul de a stabili prezenţa extensiei şi de a urmări rezultatele terapeutice. Simultan se investighează şi alţi hormoni adenohipofizari, apariţia lor în LCR fiind corelată cu creşterea valorilor lor plasmatice (102, 103). S-a observat totuşi că, în unele cazuri în care hipotalamusul este afectat din cauze tumorale şi netumorale extrahipofizare, concentraţia LH (nu şi a FSH) poate fi mai mare în LCR decît în plasmă (104, 105) sau creşte peste valorile întîlnite la normali (105, 106).

Pregătirea bolnavului şi a prizelor de LCR. Orice medicaţie este întreruptă, *stress*-ul este evitat. Bolnavul este puncţionat în poziţie şezînd şi se prelevează LCR prin ac uscat steril, cu grijă ca lichidul să nu curgă în jet (se micşorează scurgerea prin îngustarea lumenului cu un mandren). Simultan, se recoltează şi sînge.

Cînd se fac determinări unicat, proba de sînge se recoltează înainte de LCR, pe cînd în condiţii de probe dinamice se recoltează simultan şi anume după puncţia lombară şi astuparea acului; cînd bolnavul este liniştit, se puncţionează şi vena. Pentru prelevări unicat, se culeg două probe de LCR: la 1 şi la 5 minute după puncţia lombară. După terminarea recoltării se recomandă pacientului un repaus în decubit dorsal pe un pat tare, timp de minimum 2 ore. Se recoltează 0,5—2 ml LCR per priză. Se conservă prin congelare (107).

La dozare, în special dacă sistemul RIA implică separare prin procedee de adsorbţie ca de exemplu pe cărbune-dextran, se ţine seama că concentraţia proteinelor în LCR este de aproape 200 de ori mai mică decît în plasmă (20—40 mg/100 ml LCR faţă de 6—8 g/100 ml plasmă). Concentraţia sodiului este similară în cele două lichide biologice (140 mEq/l).

Rezultat. Concentraţia gonadotrofinelor în LCR la normali este prezentată în tabelul II.2.8. În ceea ce priveşte valoarea clinică a rezultatelor, măsurarea concentraţiei LH şi FSH în LCR are importanţă în special pentru elucidarea mecanismelor de transfer hormonal între hipofiză şi LCR şi între

Scanned with OKEN Scanner

circulația sanguină și cea a LCR. Valoarea diagnostică a acestor determinări a fost probată numai pentru tumorile cu extensie supraselară, cazuri în care raportul hormonal LCR / plasmă crește, putînd deveni supraunitar.

Tabelul II.2.8.

Concentrația LH și FSH în LCR la persoane adulte normale
(cazuistica Institutului de endocrinologie)

	LH mU/ml		FSH mU/ml	
	limite	$\bar{X} \pm ES$[a]	limite	$\bar{X} \pm ES$
Femei	1,49—2,03	1,81 ±0,12	0,74—4,70	1,94±0,46
Bărbați	1,05—3,58	1,90±0,29	0,96—3,08	1,97±0,16

[a] $\bar{X}$ = media; ES = eroarea standard a mediei.

2.5. PROLACTINA (Prl)

2.5.1. INTRODUCERE

Abia din anul 1970 se știe că prolactina umană este un hormon distinct de HGH.

Locul de sinteză și rezerva. Prolactina umană (hPrl) este secretată de celulele prolactinotrope ale hipofizei anterioare. Conținutul hipofizei umane este de aproximativ 50 μg, ceea ce reprezintă de 100 de ori mai puțin decît conținutul în HGH. Raportul conținut hipofizar / conținut plasmatic este doi (pentru o valoare bazală de 10 ng/ml) față de 200 pentru raportul HGH hipofiză / plasmă. În unități de masă, hPrl dă nivelul plasmatic cel mai ridicat dintre toți hormonii hipofizei anterioare.

Natura chimică. hPrl este un hormon proteic cu GM de aproximativ 22 000; se cunoaște secvența primelor 40 de reziduuri de aminoacizi de la capul N-terminal. Electroforetic, hPrl migrează mai lent decît HGH la pH=9,5 și ceva mai rapid la pH=4,5. Seamănă structural cu prolactina ovină, cu care dă reacții încrucișate; deși seamănă structural și cu HPL, acesta nu interferează reacția dintre hPrl și antiserul omolog.

Funcția. Experiențele pe animal au sugerat multiple roluri ale prolactinei ca de exemplu în controlul homeostaziei apei și electroliților. Totuși aceste funcții nu sînt confirmate încă la om. Cert este că hPrl are un rol în *controlul lactației* și al *funcției gonadice.*

Prolactina este unul dintre hormonii esențiali pentru *inițierea* și *menținerea* lactației.

Sindroamele clinice cu *hipoprolactinemie* sînt rare, de exemplu necroza sau infarctul hipofizar ca în sindromul Sheehan, în care femeia nu poate alăpta.

Există situații clinice *fiziologice* cu hiperprolactinemie: nivelul hPrl crește în sarcină și rămîne crescut după naștere dacă femeia alăptează. Cît timp durează această hiperprolactinemie fiziologică, funcția ovariană ciclică este

Scanned with OKEN Scanner

întîrziată, deşi secreţia gonadotrofinelor are loc ca şi la femeia care nu alăptează. Astfel, prolactina interferează revenirea la normal a funcţiei gonadice şi acţionează ca un anticoncepţional natural (108). Creşterea prolactinei în condiţii bazale şi în timpul suptului se estompează pe măsură ce alimentaţia la sîn este înlocuită cu cea artificială, observîndu-se în acest sens diferenţe generate de condiţia socio-economică (109).

Au fost descrise, la ambele sexe, diferite situaţii patologice asociate cu hiperprolactinemie (tabelul II.2.9.). Dintre acestea, cele mai importante, în ceea ce priveşte rezultatul terapeutic specific sînt tulburările menstruale manifestate prin amenoree, cu sau fără galactoree şi sterilitate. Incidenţa hiperprolactinemiei la femei cu amenoree secundară depăşeşte 30% (110, 111, 112) şi este corelată etiologic cu insuficienţa gonadică (108).

Tabelul II.2.9.

Situaţii clinice asociate cu secreţie inadecvată de prolactină

Hiperprolactinemie	Hipoprolactinemie
Formaţiuni tumorale	Panhipopituitarism
Hipofiza: adenoame, microadenoame secretante de prolactină; adenomul cromofob; tumori secretante de somatotrop	Sindrom Sheehan
Craniofaringiom	
Metastaze în hipotalamus	
Neoplasme cu secreţie ectopică de prolactină	
Sindroame clinice	
Galactoree + hiperprolactinemie:	
— Sindrom Forbes-Albright	
— Sindrom Chiari-Frommel	
— Sindrom del Castillo	
Acromegalie	
Hipotiroidie	
Diabet insipid	
Tulburări menstruale:	
— amenoree ± galactoree şi sterilitate	
— sindrom premenstrual	
— menopauză precoce	
Insuficienţă gonadică:	
— sindromul de ovar polichistic	
— impotenţă cu infertilitate (bărbat)	
Alte boli:	
— Sindrom Nelson	
— Boală Parkinson	
— Migrenă	
— Artrită reumatoidă	
— Diabet zaharat	
— Insuficienţă hepatică	

În practica medicală, s-ar putea ca hiperprolactinemia să fie tulburarea hipotalamo-hipofizară cea mai frecventă şi în lipsa unor determinări adecvate ale prolactinei rămîne nediagnosticată (108). La ambele sexe, incidenţa

Scanned with OKEN Scanner

galactoreei cu hiperprolactinemie este de aproximativ 30%. S-ar putea ca la majoritatea bolnavilor cu tumori hipofizare, hipogonadismul asociat să nu fie datorit unui deficit de gonadotropi ci unui exces de prolactină (108), iar sindroamele hiperprolactinemice descrise sub diferite denumiri ca: Forbes-Albright, Argonz del Castillo și Chiari-Frommel, să nu fie decît una și aceeași situație clinică (108).

Acțiuni farmacologice și influențe din mediu. În mare parte, fiziologia prolactinei a fost descifrată cu ajutorul substanțelor care cresc sau scad concentrația serică a hormonului (tabelul II.2.10). Mecanismele prin care multe din aceste substanțe influențează concentrația periferică a prolactinei sînt puțin cunoscute. Admițînd dopamina (DA) ca principal factor inhibitor al prolactinei (PIF), o serie de substanțe acționează ca blocanți ai receptorilor DA, iar altele ca eliberatori ai DA (tabelul II.2.10). Medicamentele colinergice scad prolactinemia dar, paradoxal, și atropina are același efect (113).

Tabelul II.2.10.

Influențe asupra eliberării prolactinei în circulația sanguină

Creștere	Scădere
PRF (ipotetic) TRH Serotonina Prostaglandine Estrogeni Anestezice	PIF (ipotetic) Dopamina L-Dopa Derivați { — ergotici — ergolinici
Blocanți ai receptorilor dopaminei: Psihotrope: — fenotiazine (ex. clorpromazina) — butirofenone (ex. haloperidol) — piridine (ex. pimozid) Antivomitive: — meclopropamida	Colinergice — pilocarpina } la șobolan — fizostigmina } Atropina Dexametazona
Substanțe care blochează dopamina: Hipotensoare: — rezerpina — aldomet — metil dopa	
Fiziologice: — somn — sarcină — alăptare — stimulare mamară — post-coit (la femei cu orgasm)	
Stress: chirurgical venepuncție	

Anestezia cu eter și *stress*-ul chirurgical descarcă prolactina, crescînd concentrația sa în circulația sanguină (114).

Reglare și control. Dintre hormonii hipofizei anterioare, secreția prolactinei ca și a LGH se află sub control hipotalamic de tip inhibiție tonică.

Scanned with OKEN Scanner

Orice întrerupere a legăturii hipofizei normale cu hipotalamusul duce la scăderea secreţiei tuturor hormonilor antehipofizari, cu excepţia prolactinei a cărei sinteză şi eliberare creşte. Experimental, hipofiza de şobolan transplantată la distanţă, de exemplu sub capsula renală, secretă un singur hormon — prolactina.

Autoreglare: mecanismele de reglare şi control implică un *feed-back* scurt, rezultat din inhibiţia secreţiei de prolactină prin ea însăşi. Acest tip de *feed-back* este clar sugerat de experienţele de transplant de hipofiză de la alt animal asupra secreţiei propriei hipofize a gazdei lăsată *in situ*. Inhibiţia pare să rezulte din creşterea PIF.

Reglare hormonală. Estrogenii au acţiune directă de creştere a prolactinei prin creşterea ratei mitozelor în celulele prolactinosecretoare. Estrogenii şi alţi steroizi gonadici pot influenţa mecanismele *feed-back* prin alterarea metabolismului catecolaminelor.

Reglarea hipotalamică. Se pare că DA este principalul PIF (115, 116); totuşi există date care sugerează prezenţa unei substanţe necatecolaminice cu rol de PIF (117 citat de 108).

TRH descarcă prolactina la om (118, 119) dar nu pare să fie PRF fiziologic, deoarece comportarea TSH şi prolactinei, în condiţii fiziologice, diferă. Dealtfel, au fost publicate unele date asupra existenţei unui PRF, distinct de TRH (120), încă insuficient caracterizat.

Se crede că şi serotonina descarcă prolactina, în special în timpul somnului la om. Cert este numai că administrarea precursorilor serotoninei stimulează secreţia prolactinei la om.

Datele actuale asupra mecanismelor de control şi asupra nivelului posibil de interferenţă a secreţiei prolactinei sînt redate în fig. II.2.22.

Problema mecanismelor de acţiune ale secreţiei prolactinei suferă revizuiri rapide, de aceea este util să fie consultate monografiile periodice asupra acestor aspecte (121, 122, 123).

2.5.2. METODE BIOLOGICE DE CANTIFICARE

Măsurarea prolactinei în ţesuturile biologice, hipofiză, tumori secretante de prolactină, a fost posibilă cu ajutorul metodelor biologice. Acestea se bazează pe acţiunile fiziologice pe care prolactina le exercită la mamifere şi păsări.

Metode biologice in vivo: — metodă bazată pe proliferarea guşii de porumbel sau turturică cu sensibilitate de 0,1 UI (124, 125);

— metodă bazată pe iniţierea secreţiei lactate la iepuroaice pseudogravide;

— metodă bazată pe inducerea răspunsului stratului decidual din coarnele uterine la şobolanca sau şoricioaica hipofizectomizată.

Metode biologice in vitro. Metoda biologică *in vitro* se bazează pe acţiunea prolactinei de iniţiere a lactaţiei pe fragmente de glandă mamară de şoarece prelevate de la femele gravide în ziua a 9-a, incubate în mediu 199 îmbogăţit cu insulină 10 μ g/ml, hidrocortizon, 20 μ g/ml şi 30% amestec de plasmă de bărbat (126, 127). Metoda are sensibilitatea de 5—10 ng/ml, deci poate fi utilă şi pentru măsurarea prolactinei în lichide biologice (128).

Scanned with OKEN Scanner

Metode radiobiologice in vitro. Radioreceptor analiza (RRA) se bazează pe observaţia că o serie de ţesuturi conţin receptori ai prolactinei. În RRA se foloseşte receptorul (membrana plasmatică) izolată din glanda mamară de iepure sau din ficatul de şobolan (129, 130, 131).

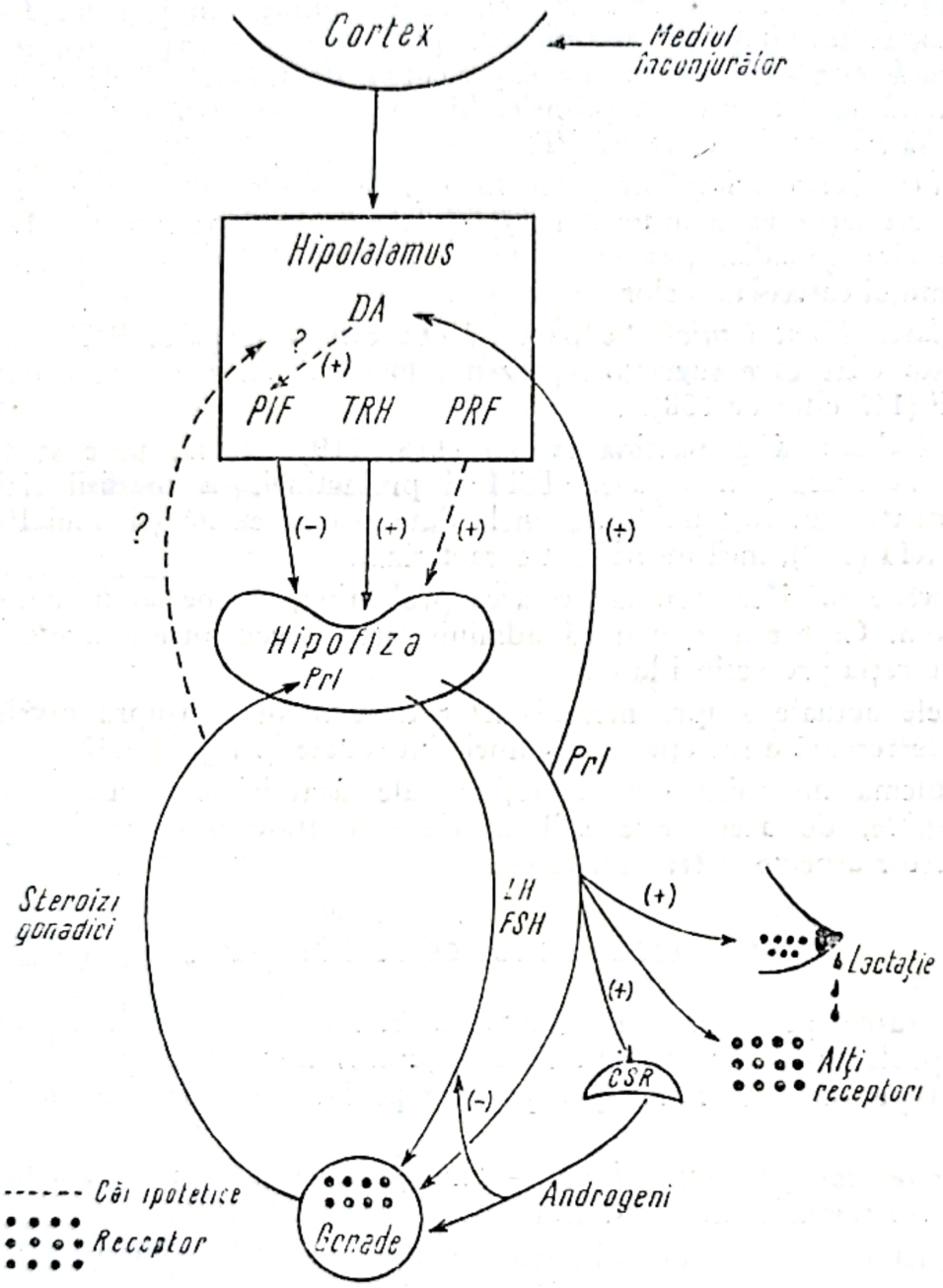


Fig. II.2.22. Schema provizorie a mecanismelor de reglare şi control al secreţiei prolactinei la om. (+)=stimulare; (—)= inhibiţie.

2.5.3. SISTEME RIA PENTRU MĂSURAREA PROLACTINEI

În ceea ce priveşte prolactina, accesul la cantităţi suficiente de prolactină umană (hPrl) pură fiind minim, au fost dezvoltate mai multe sisteme RIA: heterologe (trasor de maimuţă sau porcin şi antiser ovin) (132, 133), parţial heterologe (trasor uman, antiser ovin) (133) şi omologe (trasor şi

antiser uman) (134, 135, 136). Sistemele heterologe pun numeroase probleme de asigurare a calităţii determinărilor. Sistemul RIA omolog este folosit astăzi în majoritatea laboratoarelor.

a) *Imunogenul.* Prolactina umană hipofizară omogenizată în adjuvant are cele mai multe şanse să producă un antiser specific.

b) *Antiserul.* Calea de imunizare i.m., s.c. şi i.p. consumă mult hormon, de aceea este preferată metoda de inoculare i.d. în multiple locuri. Titrul iniţial al antiserurilor folosite în RIA variază între 1 : 2 000 şi 1 : 6 000 (136).

c) *Hormonul marcat.* hPrl pură este dizolvată în tampon fosfat 0,05 M, pH=7,6 pentru o concentraţie finală de 1 mg/ml. Pentru dizolvarea completă este necesar ca hormonul să rămînă suficient timp în solvent, timp în care nu se agită brutal, ci blînd, prin mişcări de rotaţie ale fiolei. Tamponul *nu* trebuie să conţină albumină sau alte proteine. Întrucît cantitatea de 1 mg este foarte mare, iar hPrl este un material care trebuie economisit, preparatul este distribuit în porţii de cîte 5 µl = 5 µg în fiole mici care se astupă ermetic şi se congelează imediat. În aceste fiole se face marcarea cu iod radioactiv.

Marcarea se face prin metoda uzuală cu Cloramina-T. Nu par să existe diferenţe calitative între ^{125}I-hPrl obţinută prin metoda cu Cloramina-T şi cea obţinută prin metoda cu lactoperoxidază (136).

Purificarea ^{125}I-hPrl din amestecul de marcare se face la temperatura camerei prin cromatografie pe coloană (55 × 0,9 cm) de Sephadex G-100 echilibrată cu tampon fosfat 0,01 M, 0,15 M NaCl, pH=7,6. Înainte de purificare, coloana este echilibrată cel puţin o oră cu acelaşi tampon la care s-a adăugat albumină bovină 0,25%. Fracţiunile din al doilea pisc sînt ^{125}I-hPrl pură.

Verificarea purităţii se face cu cărbune-dextran: 0,1 ml ^{125}I-hPrl care conţine aproximativ 10 000 p/m se adaugă la 0,5 ml tampon; se mai adaugă 0,1 ml ser normal de cal 50% şi apoi 1 ml de suspensie 5% cărbune (Norit-A) şi 0,5% dextran-150. După agitare, eprubetele sînt lăsate 20 minute. După centrifugare se decantează supranatantul şi se măsoară sedimentul. Dacă produsul este pur, 95% apare adsorbit pe cărbune (136). La o eficienţă a iodurării de 60%, activitatea specifică este de 120 µCi/µg, deoarece 60% din 1 mCi înseamnă 600 µCi, iar 600 µCi: 5 µg hPrl = 120 µCi/µg.

Întrucît hPrl este un material preţios, se recomandă repurificarea ^{125}I-hPrl prin acelaşi procedeu ca şi pentru amestecul de marcare. Produsul marcat poate fi folosit astfel pînă la 2 luni (136).

d) *Preparatul de referinţă.* Sînt disponibile trei preparate internaţionale standard pentru hPrl, care se distribuie cercetătorilor calificaţi: unul este oferit de NIH—NIAMDD—National Pituitary Agency (NPA), SUA şi două de către National Institute for Biological Standards and Control, Londra: standardul A (1 ng=0,35 ng Standard National Pituitary Agency) şi 2-IRP-h Prolactin.

Standardul hPrl este păstrat în soluţie cu concentraţie de 10 µg/ml, în volume de 100 µl sub —20°C în fiole închise perfect.

Preparatele standard locale (plasmă cu conţinut mare de hPrl sau lichid amniotic) sînt calibrate faţă de unul din aceste standarde internaţionale.

Dozele standard pentru curba de referinţă se desfăşoară în limite de 0,5—10 ng/ml.

Scanned with OKEN Scanner

e) *Prepararea materialelor biologice.* Prolactina nu este influenţată de alimentaţie, de poziţia corpului sau de activitatea fizică uzuală. Deoarece nivelul prolactinei creşte în cursul nopţii, probele de sînge se prelevează între orele 8—15. Dacă puncţionarea venei n-a reuşit de prima dată, se amînă recoltarea pentru altă zi. Se preferă ca probele repetate să fie prelevate prin ac păstrat în venă. Separarea cheagului se face rapid şi serul este conservat prin congelare.

Măsurarea prolactinei se face în ser sau plasmă din sînge venos şi din cordon ombilical, în lichid amniotic, în urină şi în LCR.

Probele de sînge şi de LCR pot fi recoltate în condiţii bazale sau în cursul probelor dinamice de stimulare cu TRH, Clorpromazină, L-Dopa; acestea au un interes mai mult teoretic. Au fost propuse şi probe de supresie la derivaţi ergotici.

f) *Incubarea reactivilor* se face simultan sau cu preincubare, cu avantajul că sensibilitatea creşte aproape de 3 ori (136).

g) *Separarea complexelor Ag—Ac* se face prin tehnica cu dublu anticorp.

h) *Testarea fiabilităţii sistemului*

Specificitatea este testată pe două căi diferite:

— identitatea dintre necunoscute şi standard prin proba paralelismului; între preparatele standard de hPrl şi probele biologice umane există paralelism;

— interferenţa în sistem a substanţelor cu structuri chimice înrudite prin testarea reactivităţii încrucişate.

Hormonii chimici înrudiţi ca HGH interferează în sistem numai în concentraţii de ordinul microgramelor, iar HPL, deşi structural înrudit cu hPrl, nu dă reacţie încrucişată în sistemul RIA al hPrl (136).

Sensibilitatea. Cantitatea minimă detectată este de 0,4 ng/ml şi este dependentă de eroarea în punctul zero al curbei, de pantă şi de distribuţia erorii totale.

Precizia depinde de pantă şi de distribuţia erorii şi este cu atît mai mare cu cît panta este mai abruptă şi cu cît variaţia (exprimată ca CV%) în punctul zero al curbei este mai mică. Obişnuit, ea nu trebuie să fie mai mare de CV% = 15% (136).

Variaţia intra- şi interserii. CV% pentru variaţia intraserie este de aproximativ 4—5%. Variaţia interserii, calculată cu ajutorul probelor de control, poate fi falsificată dacă probele de control n-au fost conservate perfect închise, deoarece prin congelare poate avea loc o evaporare (liofilizare lentă) dacă fiolele n-au fost asigurate.

Controlul calităţii se face cu ajutorul următorilor parametri: legarea maximă în punctul zero al curbei, legarea nespecifică, doza minimă detectabilă, concentraţia la Bi/Bo=50%, concentraţia în probele de control. Se calculează CV% în proba cu Bi/Bo=50% şi variaţia cumulativă sau interserii.

Truse RIA. Prolactina umană de înaltă puritate pentru radioiodurare, ser antiprolactină umană şi preparat de referinţă sînt oferite gratuit cercetătorilor calificaţi de NIH — NIAMDD — National Pituitary Agency (NPA) — SUA.

Preparat de referinţă este oferit gratuit de National Institute for Biological Standards and Control, Londra.

Scanned with OKEN Scanner

a) *Condiții fiziologice*

Variațiile prolactinei serice în raport cu vîrsta și sexul. Prolactina este detectabilă în hipofiza și serul *fătului* începînd din ziua a 68-a (9 săptămîni) de gestație. Concentrația sa rămîne redusă pînă în săptămîna 20—30, cînd crește brusc (137).

În *cordonul ombilical* și la *nou-născut* după expulzie, nivelul prolactinei este de aproximativ 150 ng/ml, scade apoi progresiv, atingînd nivelul perioadei adulte în 6—8 săptămîni (tabelul II. 2.11.).

În *perioada prepubertară* nu se observă modificări, valorile fiind ceva mai crescute (dar nesemnificativ) la fete decît la băieți (tabelul II.2.11).

Tabelul II.2.11.

Concentrația prolactinei serice în condiții bazale în raport cu vîrsta, sexul și sarcina (referința 137)

Grup	Prolactină (ng/ml) [1] limite
1. *Normali*	
Nou-născuți (1—5 luni)	6—15
Copii (1—5 ani)	2—12
Fete (4—17 ani)	3—19
Băieți (5—17 ani)	2—16
Femei adulte	4—21
Bărbați adulți	1—12
2. *Sarcina*	
Sînge matern la expulzie	25—400
Sînge venos ombilical la expulzie	50—400
Nou-născut (0—24 de ore)	120—200

[1] Standard Lewis 203-1 (NIH-NIAMDO-NPA) care, comparat cu Standardul A-Londra, dă corespondența de 0,35 ng St. 203-1 = 1 ng Standard A. Nu cunoaștem corespondența cu 2-IRP-hProlactină-Londra.

La *femeile* în *postclimacteriu*, prolactina scade. Scăderea cea mai bruscă este legată de climacteriu, dar începe înainte de instalarea acestei faze.

La *bărbați* în *postclimacteriu*, prolactina crește față de perioada adultă.

Și răspunsul la TRH se modifică cu vîrsta, fiind mai redus la femeile în postmenopauză și mai crescut la bărbați de vîrste comparabile (138) (tabelul II.2.12).

Tabelul II.2.12

Răspunsul prolactinei serice la TRH în raport cu vîrsta, la persoane normale (referința 138 modificat)

Sex	Vîrsta	Creșterea hPrl după TRH (ng/ml, limite)	Raportul dintre creșterea maximă și cea minimă
Femei	20—39	30—120	4
	40—59	20—100	5
	60—79	10—100	10
Bărbați	20—39	15—40	3
	40—59	10—50	5
	60—79	5—90	18

Scanned with OKEN Scanner

Variaţiile prolactinei în sarcină. Concentraţia în serul matern creşte progresiv şi pare legată de concentraţia crescută de estrogeni, deşi la maimuţa Rhesus nu creşte prolactina.

În perioada postpartum creşte prin stimulare reflexă în intervalul de 10—30 minute după supt apoi pînă la suptul următor revine la normal.

Variaţiile prolactinei şi ritmurile biologice. Ritmul circadian. Există un ritm zi-noapte al secreţiei prolactinei corelat cu somnul (139, 140, 141). Concentraţia prolactinei creşte în timpul nopţii imediat după instalarea somnului şi scade spre dimineaţă, dar mai poate creşte şi în timpul zilei dacă subiectul aţipeşte. Apar şi *ritmuri intrasomn* şi anume, concentraţia maximă în timpul somnului non-REM (142).

Ciclul menstrual. Au fost descrise creşteri ale concentraţiei prolactinei la mijlocul ciclului dar n-au fost confirmate. Se crede că prolactina nu ar fi esenţială pentru funcţia gonadei în cursul ciclului menstrual deoarece în inhibiţia cu bromocriptină au loc cicluri ovulatorii normale şi femeile devin gravide. Totuşi supresia unor valori mari ale prolactinei cu bromocriptină nu înseamnă dispariţia prolactinei, ci reducerea la un nivel normal.

Secreţia pulsatilă. Determinări ale prolactinei la intervale de cîteva minute arată fluctuaţii mari, fapt care trebuie reţinut cînd punem bază pe o singură valoare sau cînd apreciem rezultatul unui test dinamic (108).

b) *Condiţii patologice*

Situaţiile patologice cu hiper- şi hipoprolactinemie sînt prezentate în tabelul II.2.9. Valorile obţinute variază în limite destul de largi (tabelul II.2.13).

Tabelul II.2.13.

Concentraţia prolactinei serice la bolnavi cu secreţie inadecvată de prolactină (referinţa 137 modificat)

Diagnostic	Prolactina (ng/ml) limite
Insuficienţă a HGH (izolată)	5—16
Insuficienţă hipofizară plurihormonală	2—50
Tumori hipotalamice	2—15
Hipotiroidie primară	4—80
Acromegalie: femei	10—60
bărbaţi	3—35
Galactoree cu tumoare hipofizară	300—11 000

Indicaţiile de rutină ale dozării prolactinei în ser sînt:

— boli hipotalamo-hipofizare;
— infertilitate;
— tulburări gonadice, ale ciclului menstrual, cu sau fără galactoree;
— toate cazurile cu galactoree.

c) *Prolactina în urină*

Concentraţia prolactinei serice se modifică rapid, una din cauze este semiviaţa scurtă (15—20 minute). De aceea s-a recurs la măsurarea prolactinei în urină, care nu se poate face decît după concentrarea prealabilă a urinii. Interpretarea rezultatelor este totuşi dificilă, deoarece se pare că tubii

Scanned with OKEN Scanner

proximali reabsorb rapid hormonul. Determinarea concentrației prolactinei în urină ar putea fi o măsură a degradării prolactinei în organism.

d) *Prolactina în LCR*

La animal, s-a arătat că prolactina trece din circulația sanguină în LCR. Se pare că interacțiunea prolactină-cortizol are un rol în drenarea LCR prin granulațiile arahnoidiene printr-un mecanism similar cu cel care reglează permeabilitatea membranei amniotice.

În clinica umană s-a observat asocierea meningioamelor (deseori tumori ale granulațiilor arahnoide) cu cancerul de sîn. Prolactina este prezentă în LCR la normali și crește în perturbările hipotalamice (143, 144).

e) *Prolactina și masa eritrocitară*

S-a arătat că eritrocitele pot lega prolactina (122, 123, 145). În concentrații fiziologice, prolactina poate modifica migrarea ionilor prin membrana eritrocitului. În plasmă din sîngele prelevat pe anticoagulant s-a observat o tendință la creștere a prolactinei la femei și scădere la bărbat. Nu a fost stabilită semnificația fiziologică a acestui proces de legare sau poate numai de adsorbție.

BIBLIOGRAFIE

1. **Glick S. M., Roth J., Yalow R. S., Berson S. A.** — Nature (Lond.), 1963, *199*, 784.
2. **Schalch D. S., Parker M. L.** — Nature (Lond.), 1964, *203*, 1 141.
3. **Simionescu L., Stamatescu R.** — Stud. Cercet. Endocr.. 1971, 22/1, 57.
4. **Simionescu L.** — Stud. Cercet. Endocr., 1971, 22/3, 181.
5. **Raben M. S.** — Science, 1957, *125*, 3 253, 883.
6. **Raben M. S.** — În: „Recent Progress in Hormone Research" (editat de G. Pincus), Academic Press Inc., New York-Londra, 1959, V. 15, p. 71.
7. **Simionescu L., Stamatescu R.** — Stud. Cercet. Endocr., 1969, 20/3, 277.
8. **Simionescu L., Stamatescu R.** — Stud. Cercet. Endocr., 1970, 21/1, 63.
9. **Simionescu L.** — Stud. Cercet. Endocr., 1970, 21/2, 171.
10. **Simionescu L., Dinulescu E.** — Stud. Cercet. Endocr., 1970, 21/5, 439.
11. **Simionescu L.** — În: „Compuși marcați și radiofarmaceutice cu aplicații în medicină", Ed. Acad. R.S.R., București, 1979.
12. **Șerban A. M. D., Simionescu L.** — În: „Fertility and Sterility" Excerpta Med. Amsterdam, American Elsevier Publishing. Co. Inc., New York, 1973, p. 743.
13. **Peake G. T.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press, New York — San Francisco — Londra, 1974, p. 103.
14. **Root A. V.** — În: „Human Pituitary Growth Hormone", Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Ill., 1972.
15. **Laron Z., Mannheimer I., Pertzelan A., Nitzan M.** — Israel J. Med. Sci., 1966, 2, 770.
16. **Simionescu L., ș.a.** — Arch. U. M. B., 1974, *12*, 618.
17. **Noel G. L., Suh H. K., Stone G. J., Frantz A. G.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1972, *35*, 840.
18. **Handoca A., Simionescu L., Dimitriu V., Oprescu M., Mirodon Z.** — Rev. Roum. Med. Endocrinol., 1976, *14*, 147.
19. **Pitiș M., Milea E., Simionescu L., Dinulescu E.** — Rev. Roum. Endocrinol., 1973, 10/5, 463.
20. **Milea E., Simionescu L., Pitiș M.** — Rev. Roum. Endocrinol., 1973, 10/6, 561.
21. **Pitiș M., Milea E., Simionescu L., Stamatescu R.** — Rev. Roum. Endocrinol., 1973, 10/1, 59.
22. **Popa M., Florea I., Simionescu L., Juvina E.** — Rev. Roum. Endocrinol., 1973, 10/5, 477.

Scanned with OKEN Scanner

23. **Florea I., Popa M., Simionescu L., Juvina E., Diamand V.** — Rev. Roum. Endocrinol., 1973, 10/6, 519.
24. **Popa M., Florea I.** — Biomed. Express., 1975, *23*, 131.
25. **Florea I., Popa M., Simionescu L., Dinulescu E., Juvina E.** — Rev. Roum. Med. Endocrinol., 1976, *14*, 131.
26. **Florea I., Popa M., Simionescu L., Dinulescu E., Juvina E.** — Clinical Endocrinol., 1976, *5*, 283.
27. **Pitiș M., Chivu V., Radian N., Simionescu L., Dinulescu E.** — Rev. Roum. Endocrinol, 1974, 11/3, 227.
28. **Linfoot J. A., Gracia J. F., Wei W., Fink R., Sarin R., Born J. L., Lawrence J. H.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1970, *31*, 230.
29. **Coculescu M., Simionescu Ligia, Constantinovici Al., Simionescu M., Longin S., Oprescu Maria, Dimitriu Victoria, Grigorescu F., Temeli Eleni** — 2nd European Workshop on Pituitary adenomas. Biology, Physiopathology and Treatment, Paris, Septembrie 20—22, 1979, p. 50.
30. **Pierce J. G.** — Endocrinol., 1971, *89*. 1 331.
31. **Burger H. G., Patel Y. C.** — În: „Clinics in Endocrinology and metabolism" (editat de G. M. Besser), W. B. Saunders Co. Ltd., Londra, 1977, vol. 6, nr. 1, p. 83.
32. **Ingbar S. H.** — Mayo Clinic Proc., 1972, *47*, 814.
33. **Evered D., Vice P. A., Clark F.** — The Investigation of Thyroid Disease, The Radiochemical Centre, Amersham, England, 1976.
34. **Le Marchand-Béraud T.** — Acta Endocrinol., 1970, *64*, 610.
35. **Condliffe P. G.** — Endocrinol., 1973, *72*, 893.
36. **Utiger R., Odell W. D., Condliffe P. G.** — Endocrinol., 1963, *73*, 359.
37. **Utiger R. D.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press, New York, 1974, p. 161.
38. **Bangham D. R., Cotes P. M.** — În: „Radioimmunoassay Methods" (editat de K. E. Kirkham și W. M. Hunter), Churchill Livingstone, Edinburgh, 1971.
39. **Pfannenstiel P.** — Diagnosis of Thyroid Diseases, Byk-Mallinekrodt-Radiopharmaceutical Diagnostika, Kern and Birner, Frankfurt am Main, 1975.
40. **Landon J.** — Supra Regional Assay Service, (SAS), 2.2.76. (1976).
41. **Besser G. M., Orth D. N., Nicholson W. E., Byyny R. L., Abe K., Woodham J. P.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1971, *32*, 595.
42. **Aubert M. L.** — Critical Study of the Radioimmunological Assay for the Dosage of the Polypeptide Hormones in Plasma, Edizioni Minerva Medica, Torino, 1971.
43. **Sayers M. A., Sayers G. W., Woodbury P. L.** — Endocrinol., 1948, *42*, 379.
44. **Recant L., Gume D. M., Forsham P. H., Thorn G. W.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1950, *10*, 187.
45. **Li C. H., Fnss-Bech I. I., Geschwind T., Hayashida T., Hungerford G., Lohstroii A. J., Lyons W. R., Moon H. D., Reinhardt W. O., Sideman M. B.** — J. Exp. Med., 1957, *105*, 335.
46. **Nelson D. H., Hume D. M.** — Endocrinol., 1955, *57*, 184.
47. **Lipscomb H. S., Nelson D. H.** — Endocrinol., 1962, *71*, 13.
48. **Beaven D. W., Espiner E. A., Hart D. S.** — J. Physiol., 1964, *171*, 216.
49. **Vernikos-Danellis J., Anderson E., Trigg L.** — Endocrinol. 1966, *79*, 624.
50. **Sayers G., Swalow R. L., Giordano N. D.** — Endocrinol., 1971, *88*, 1 063.
51. **Chayen J., Loveridge N., Daly J. R.** — Clin. Sci., 1971, *41*, 2P.
52. **Holdaway I. M., Rees H., Landon J.** — Lancet, 1973, *2*, 1 170.
53. **Rees L. H., Ratcliffe J. G., Besser G. M., Kramer R., Landon J., Chayen J.** — Nature New Biol., 1973, *241*, 84.
54. **Orth D. N.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press, New York, 1974, p. 125.
55. **Taunton O. D., Roth J., Pastan I.** — J. Biol. Chem., 1969, *244*, 247.
56. **Lefkowitz R. J., Roth J., Pastan I.** — Science, 1970, *170*, 633.
57. **Wolfsen A. R., Mc. Intire H. B., Odell W. B.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1972, *34*, 684.
58. **Yalow R. S., Glick S. M., Roth J., Berson S. A.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1964, *24*, 1 219.
59. **Yalow R. S., Berson S. A.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow), North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, vol. 2 A, p. 371.
60. **Ransom J. P.** — Practical Competitive binding assay methods, The C. V. Mosby Co., Saint Louis, 1976, p. 91.

Scanned with OKEN Scanner

61. **Donald R. A.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker, Inc., New York-Basel, 1977, p. 319.
62. **Scott A. P., Lowry P. J.** — Biochem. J., 1974, *139*, 593.
63. **Rees L. H.** — În: „Clinics in Endocrinology and Metabolism" (editat de G. M. Besser), W. B. Saunders Co Ltd., Londra, 1977, vol. 6, nr. 1, p. 137.
64. **Williams W. C., Island D., Oldfield R. A. A., Liddle G. W.** — J. Clin. Endocrinol., Metab., 1961, *21*, 426.
65. **Donald R. A.** — J. Endocrinol., 1967, *39*, 451.
66. **Edwards C. R. W.** — The hypothalamic-pituitary-adrenal axis, Medical, Monograph 10, The Radiochemical Centre, Amersham, England, 1976.
67. **Gallagher T. F., Yoshida K., Roffwarg H. D., Fukushima D. K., Weitzman E. D., Hellman L.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1973, *36*, 1 058.
68. **Allen J. P., Kendall J. W., Mc. Gilvra R., Vaneura C.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1974, *38*, 586.
69. **Landon J., Friedman M., Greenwood F. C.** — Lancet, 1967, *1*, 652.
70. **Fleischer N., Abe K., Liddle G. W., Orth D. N., Nicholson W. E.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1967, *46*, 196.
71. **Shome B., Parlow A. F.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1974, *39*, 199.
72. **Shome B., Parlow A. F.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1974, *39*, 203.
73. **Reichert L. E.** — Endocrinol., 1971, *89*, 925.
74. **Amir S. M.** — Acta Endocrinol., 1972, *70*, 21.
75. **Parlow A. F., Shome B.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1974, *39*, 195.
76. **Frieden E. H.** — Chemical Endocrinology, Academic Press, New York, 1976.
77. **Modigliani E.** — În: „Glandes Endocrines" (editat de H. Bricaire, E. Baulieu, J. Lepart), Flammarion Médicine Sciences, Paris, 1976, p. 93.
78. **Daughaday W. H.** — În: „Textbook of Endocrinology", ed. V. (editat de R. H. Williams), W. B. Saunders, Co., Philadelphia, 1974, p. 31.
79. **Ross G. T., Van de Wiele R. L.** — În: „Textbook of Endocrinology", ed. V. (editat de R. H. Williams), W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1974, p. 368.
80. *** * *** — Endocrinologie ginecologică, Ed. Acad. R.S.R., București, 1968, 433 pag.
81. **Paulsen C. A.** — În: „Textbook of Endocrinology", ed. V. editat de R. H. Williams), W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1974, p. 323.
82. *** * *** — Andrologie clinică, Ed. Acad. R.S.R., București, 1970, 347 pag.
83. **Wide L., Ross P., Gemzell C. A.** — Acta Endocrinol., 1961, *37*, 445.
84. **Lee C. Y., Ryan R. Y.** — Endocrinol., 1971, *89*, 1 515.
85. **Means A. R., Vaitukaitis Y.** — Endocrinol., 1972, *90*, 39.
86. **Odell W. D., Ross G. T., Rayford P. L.** — Metabolism, 1966, *15*, 287.
87. **Franchimont P.** — Le dosage des hormones hypophysaires somatotrope et gonadotropes et son application en clinique, Ed. Arscia S. A., Bruxelles, 1967.
88. *** * *** — WHO Expert Committee on Biological Standardization, Technical Report Series 565, WHO-Geneva, 1975.
89. *** * *** — Radioimmunoassay of hormones for clinical trials of fertility regulating agents in developing countries, Technical Report Series, 587, WHO, Geneva, 1975.
90. **Franchimont P.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow), North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, vol. 2 A, p. 518.
91. **Moudgal N. R., Madhwa H. G., Raj** — În: „Methods of Hormone Radioimunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press, New York, 1974, p. 57.
92. **Torjesesen P. A., Sand T., Norman N., Trygstad O., Foss I.** — Acta Endocrinol., 1974, *77*, 485.
93. **Torjesesen P. A., Sand T.** — Acta Endocr., 1975, *78*, 22.
94. **Naftolin F., Yen S. S. C., Tsai C. C.** — Nature New Biol., 1972, *236*, 92.
95. **Yen S. S. C., Vicic W.** — Amer. J. Obstet. Gynec., 1970, *106*, 134.
96. **Faiman C., Winter J. S. D.** — Nature (Lond.), 1971, *232*, 130.
97. **Simionescu L., Dimitriu V., Iliescu C.** — Rev. Roum. Med. Endocrinol., 1975, *13*, 201.
98. **Yen S. S. C., Vela P., Rankin J.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1970, *30*, 435.
99. **Akande E. O., Bonnar J., Carr P. J., Corker C. S., Dutton A., Mac Kinnon P. C. E., Robinson D.** — Lancet, 1972, *2*, 112.

Scanned with OKEN Scanner

100. **Santen R. J., Leonard J. M., Sherins R. J., Gandy H. M., Paulsen C. A.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1971, *33*, 970.
101. **Boyar R. M., Finkelstein J. W., Witkin W.** și colab. — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1973, *36*, 64.
102. **Jordan R. M., Kendall J. W.** și colab. — Ann. Int. Med., 1976, *85*, 49.
103. **Kendall J. W., Jordan R. M.** — În: „Fifth International Congress on Endocrinology", Hamburg, 18—24 iulie 1976, Abstr. Short Commun., no. 418, p. 171.
104. **Coculescu M., Oprescu M., Ioanitiu D., Matulevicius V.** — În: Symposium of the International Society of Psychoendocrinology", Visegrad, 1975, Publ. House Hung. Acad. Sci., 1975, p. 233.
105. **Coculescu M.** — Modificări ale concentrației hormonilor adenohipofizari și ai hormonilor epifizei în diabetul insipid, Teză de doctorat, București, 1975.
106. **Oprescu M., Coculescu M., Dimitriu V., Jager A. C.** — În: „Al treilea Congres Național de Endocrinologie", București, 1976.
107. **Kendall J., Orwoll E.** — In: „Frontiers in Neuroendocrinology" (Martini L., Ganang N. F., editors), Raven Press, New-York, 1980, p. 33.
108. **Thorner M. O.** — În: „Clinics in Endocrinology and Metabolism" (editor invitat G. M. Besser), W. B. Saunders Co Ltd., Londra, 1977, p. 201.
109. **Robyn C., Delvoye V., Van Exter C., Vekemans M., Caufriez A., Nayer P., Delogne-Desnoeck J., l'Hermite M.** — În: „Prolactin and Human Reproduction: Proceedings of Serono Symposium" (editat de P. G. Crosignani și C. Robyn), Academic Press, Londra, 1977.
110. **Franks S., Murray M. A. F., Jequier A. M., Steele S. J., Nabarro J. D. N., Jacobs H. S.** — Clinical Endocrinology, 1975, *4*, 597.
111. **Seppala M., Hirvonen E., Ranta T., Virkkunen P., Leppaluoto S.** — Brit. Med. J., 1975, *2*, 305.
112. **Bohnet H. G., Dahlen H. G., Wuttke W., Schneider H. P. G.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1976, *42*, 132.
113. **Friesen H. G.** — Metab., 1973, *22*, 1 039.
114. **Noel G. L., Suh H. K., Stone G., Frantz A. G.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1972, *35*, 840.
115. **Mac Leod R. M.** — În: „Frontiers in neuroendocrinology" (editat de L. Martini și F. Ganong), Raven Press, New York, 1976, vol. 4, 169.
116. **Schally A. V., Dupont A., Arimura A., Takahara J., Redding T. W., Clemens J., Sharr C.** — Acta Endocrinol., 1976, *82*, 1.
117. **Dupont A., Redding T. W.** — În: „Programme of the 57th Meeting of the Endocrine Society", New York, 1975 Abstract No. 85.
118. **Jacobs L. S., Snyder P. J., Wilber J. F., Utiger R. D., Daughaday W. H.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1971, *33*, 996.
119. **Noel G. L., Suh H. K., Frantz A. G.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1974, *35*, 840.
120. **Valverde R. C., Chieffo V., Reiclin S.** — Endocrinol., 1972, *91*, 982.
121. **Horrobin D. F.** — Prolactin 1974, Medical and Technical Publ. Co Ltd., Lancaster, 1974, 150 pag.
122. **Horrobin D. F.** — Prolactin 1975, Eden Press, Montreal, 1975, 198 pag.
123. **Horrobin D. F.** — Prolactin 1976, Eden Press, Montreal, 1976, 208 pag.
124. **Riddle O., Bates R. W., Dykshorn S.** — Amer. J. Physiol., 1933, *105*, 191.
125. **Grosvenor C. E., Turner C. W.** — Endocrinol., 1958, *63*, 530.
126. **Frantz A G, Kleinberg D. L.** — Science, 1970, *170*, 745.
127. **Kleinberg D. L., Frantz A. G.** — J. Clin. Invest., 1971, *50*, 1 557.
128. **Frantz A. G.** — În: „Comparative Endocrinology of Prolactin" (editat de H. D. Dellman, J. A. Johnsen, D. M. Klachko), Plenum Press, New York, 1977, p. 95.
129. **Friesen H., Guyda H., Hwang P., Tyson J. E., Barbeau A.** — J. Clin. Invest., 1972, *51*, 706.
130. **Shin R. P. C., Kelly P. A., Frieden H. G.** — Science, 1973, *180*, 968.
131. **Posner B. I., Kelly P. A., Shiu R. P. C., Friesen H. G.** — Endocrinol., 1974, *96*, 521.
132. **Hwang P., Guyda H. Y., Friesen H. G.** — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1971, 68, 1 902.
133. **Jacobs L. S.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press, New York, 1974, p. 87.
134. **Sinha Y. N., Selby F. W., Lewis U. J., Van der Laan W. P.** — J. Clin. Endocrinol., 1973, *36*, 509.

Scanned with OKEN Scanner

135. **Aubert M. L., Grumbach M. M., Kaplan S. L.** — Acta Endocrinol., 1974, *77*, 460.
136. **Aubert M. L.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York, 1977, p. 179.
137. **Aubert M. L., Grumbach M. M., Kaplan S. L.** — J. Clin. Invest., 1975, *56*, 155.
138. **Snyder P. J., Jacobs L. S., Rabello M. M., Sterling F. H., Shore R. N., Utiger R. D., Daughaday W. H.** — Ann. Intern. Med., 1974, *81*, 751.
139. **Nokin J., Vekemans M., l'Hermite M., Robyn C.** — Brit. Med. J., 1972, *3*, 561.
140. **Sassin J. F., Frantz A. G., Weitzman E. D., Kaplan S. L.** — Science, 1972, *177*, 1 205.
141. **Parker D. C., Rossman L. G., Van der Laan E. F.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1973, *36*, 1 119.
142. **Parker D. C., Rossman L. G., Vander Laan E. F.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1974, *38*, 646.
143. **Coculescu M., Oprescu M., Dimitriu V.** — În: „V. Internat. Congr. Endocrinol.", Hamburg, 18—24 iulie 1976, Abstr. Short Commun, no. 22, p. 9.
144. **Simionescu L., Coculescu M., Oprescu M., Dimitriu V., Jäger A. C.** — În: „Internat. Symp. on Prolactin", Nisa, Oct. 1977.
145. **Zimmerman E. A., Defendini R., Frantz A. G.** - J. Clin. Endocrinol. Metab., 1974, *38*, 577.

Scanned with OKEN Scanner

3

HORMONII NEUROHIPOFIZARI ȘI AI PINEALEI ȘI PROTEINELE DE TRANSPORT

CONSIDERAȚII GENERALE

Aspecte istorice

Evoluția tehnicilor de investigație are numeroase repercusiuni asupra dezvoltării neuro-endocrinologiei. Microscopul i-a servit lui Rathke, în 1838 (1), să studieze dezvoltarea embriologică a hipofizei descrisă încă de Galen. Hipofiza derivă din două surse: invaginarea ectodermică dorsală a epiteliului bucal dă naștere lobului glandular (anterior) sau *adenohipofiza* iar un proces ventral dezvoltat din planșeul diencefalului dă naștere lobului neural (posterior) sau *neurohipofiza*. Termenii de anterior și posterior se referă la poziția față de lumenul vestigial al pungii Rathke.

Primele date asupra *funcției* hipofizei posterioare sînt datorite lui Oliver și Schafer, care în anii 1894—1895 au descoperit că extractele de medulo-suprarenală au puternică acțiune hipertensivă iar extractele de hipofiză pot *crește tensiunea arterială* (2). În 1898 Howell (3) localizează această activitate în neurohipofiză. În 1901 Magnus și Schafer (4) demonstrează efectul *antidiuretic* al extractelor de lob posterior, ale cărui implicații în patogenia și terapia diabetului insipid sînt stabilite un deceniu mai tîrziu (5, 6, 7).

Efectul de *provocare a contracțiilor uterului* a fost descoperit întîmplător de H. Dale în 1906, în timp ce studia acțiunea hipertensoare a extractelor de lob posterior la o pisică în faza inițială a gestației. Pe baze chimice, el sugerează că principiul activ este un polipeptid pe care-l numește ocitocină (8). Descoperirea se bucură de aplicarea rapidă în practica clinică pentru stimularea contracțiilor uterine (9).

În același timp, în 1910, Ott și Scott demonstrează că extractele de lob posterior au efect de *expulsie a laptelui* la animalele care alăptează (10).

Au urmat cîțiva ani de controverse privind unicitatea sau pluralitatea moleculelor responsabile de aceste efecte.

Scanned with OKEN Scanner

În 1919, Dudley (11) arată că se pot separa componentele cu activitate presoare de cele cu activitate ocitocică, descoperire larg aplicată ulterior la scară comercială (12).

Studii de ultracentrifugare arată mai tîrziu (1940) că principiul ocitocic și presor există ca o singură moleculă mare sau cu două molecule mari separate, dar cu același coeficient de sedimentare (13). Van Dyke (14) izolează o moleculă mare în care activitatea ocitocică și presoare se află în raport constant de 1 : 1. S-a demonstrat apoi că activitatea ocitocică și presoare a acestei „proteine van Dyke" este datorită ocitocinei și vasopresinei, care pot fi separate de complexul proteic prin dializă față de acizi diluați, prin precipitare cu acid tricloracetic și prin electroforeză, nu însă prin dializă față de apă sau prin ultrafiltrare (15). Acest complex proteic a fost numit *neurofizină* (16).

Ulterior, progresele chimiei au permis purificarea, determinarea secvenței și sinteza ocitocinei (17, 18, 19, 20, 21) și a vasopresinei (22, 23, 24, 25).

Paralel cu cercetările chimice, cercetările de morfologie și fiziologie au arătat legăturile hipofizei posterioare cu formațiunile nervoase.

La sfîrșitul secolului trecut Ramon Y. Cajal observă fibre nervoase care se formează înapoia chiasmei optice și ajung la neurohipofiză trecînd prin tija hipofizară. Dar rolul esențial al hipotalamusului pentru funcția hipofizei posterioare a fost descoperit întîmplător, cu ocazia unei experiențe de hipofizectomie eșuată, cînd animalul a făcut diabet insipid. Au urmat cercetările sistematice desfășurate între anii 1925 și 1940 de Ernst și Bertha Scharer (26), care au arătat că nucleii supraoptic și paraventricular au activitate secretorie. S-a arătat apoi că acești nuclei, ca și hipofiza posterioară, se colorează selectiv cu reactiv Gömöri (27), stabilindu-se astfel clar unitatea funcțională hipotalamus-neurohipofiză și anume că substanțele cu activitate ocitocică și vasopresoare sînt sintetizate în nucleii supraoptic și paraventricular, de unde sînt transportate de-a lungul axonilor cu ajutorul neurofizinelor la hipofiza posterioară unde sînt stocate și eliberate „la cerere" prin exocitoză. Forma de migrare prin axoni către neurohipofiză este cea de granule cu diametrul de aproximativ 200 nm (28), care se deplasează cu viteze de 1—3 mm pe oră (29).

Se pare însă că vasopresina este secretată nu numai de neuronii tractului neurohipofizar, cantități mari de vasopresină și neurofizină au fost demonstrate în sîngele sistemului port hipotalamo-hipofizar la maimuțe (30), ceea ce ar sugera și un rol în funcția hipofizei anterioare. Se pare de asemenea că vasopresina poate fi secretată și direct în LCR (31).

Sistemele RIA pentru ocitocină, arginin-vasopresină (AVP), arginin-vasotocină (AVT) și neurofizină pot fi folosite pentru cantificarea acestor substanțe la mai multe specii de mamifere.

Chimia octapeptidelor

O dată cu sinteza ocitocinei și vasopresinei, înainte încă de a fi identificată ca produs natural, Katsoyannis și du Vigneaud sintetizează vasotocina (32). Se conturează astfel o nouă clasă de compuși naturali, biologic activi, alcătuiți din 8 aminoacizi dacă cele două reziduuri de semicistină sînt

Scanned with OKEN Scanner

socotite ca una singură, sau din 9 aminoacizi dacă acestea sînt considerate separat. Acest aspect a dus la unele confuzii deoarece unii le numesc „nona-peptide" iar alţii „octapeptide". În cele ce urmează optăm pentru a doua alternativă.

După ce a fost sintetizată, s-a demonstrat că vasotocina, în diferite variante, este un octapeptid prezent la toate speciile cercetate, începînd cu vertebratele inferioare (33). În anul 1965, S. Pavel demonstrează prezenţa li-zin-vasotocinei la porc (34) şi a arginin-vasotocinei la bou (35) şi om (36).

La om, întîlnim trei octapeptide principale: ocitocina, arginin-vasopre-sina (AVP) şi arginin-vasotocina (AVT), care diferă între ele printr-un sin-gur aminoacid în poziţia trei: AVP—AVT şi în poziţia şapte: ocitocină—AVT sau cu doi aminoacizi în poziţiile trei şi şapte: ocitocină—AVP (fig. II.3.1.).

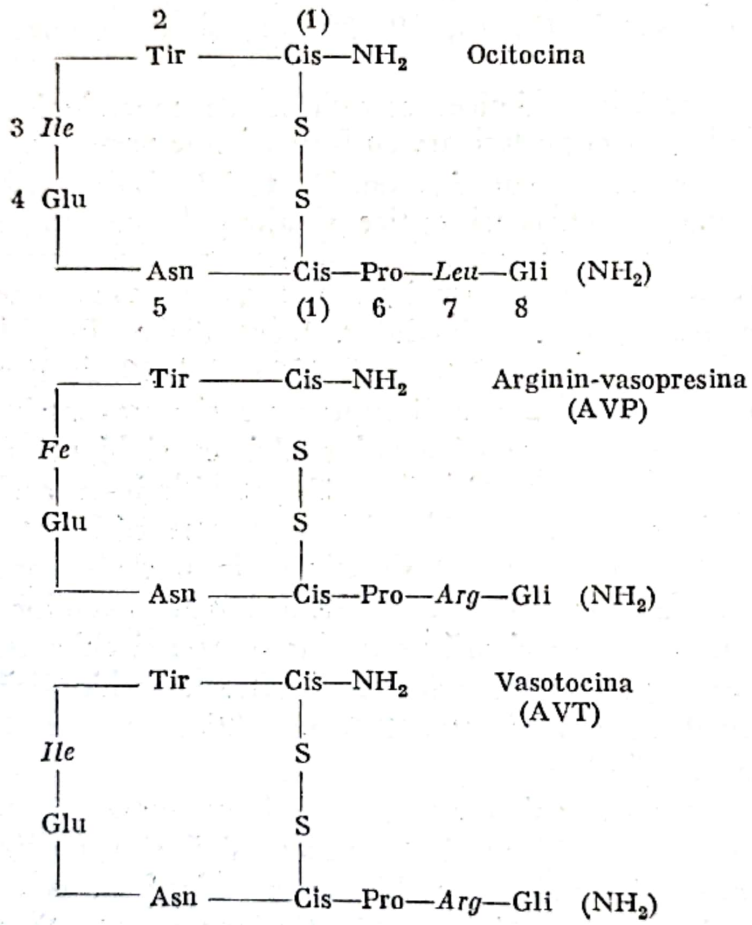


Fig. II.3.1. Structura hormonilor neuro-hipofizo-pineali.

Studiul analogilor de sinteză a arătat că modificările introduse în struc-tura chimică a octapeptidelor se reflectă în modificarea activităţilor biologice în sensul abolirii, exacerbării etc. (37, 38).

Intensitatea efectelor diferă uneori cu cîteva ordine de mărime de la un octapeptid la altul. De exemplu activitatea AVP asupra permeabilităţii vezicii de broască este echivalentă cu 70 UI/mg pe cînd cea a AVT este echivalentă cu 30 000 de UI/mg de substanţă.

Scanned with OKEN Scanner

3.1. OCITOCINA

3.1.1. INTRODUCERE

Ocitocina este un octapeptid ciclic, acid cu GM = 1 007. Deşi au fost descrise *efecte* ale ocitocinei asupra a numeroase organe şi ţesuturi, cele mai bine caracterizate şi probabil cele mai semnificative fiziologic sînt acţiunea uterotonă şi efectul de creştere a presiunii intramamare. Alte efecte descrise sînt: stimularea transportului spermei, a natriurezei, efect antidiuretic, calciuretic, vasodilatator, hiperglicemiant şi de scădere a concentraţiei acizilor graşi liberi. Efectele fiziologice ale ocitocinei par mai pregnante la femei decît la bărbaţi.

3.1.2. REGLAREA SECREŢIEI

Există o varietate de stimuli care produc eliberarea ocitocinei (39), majoritatea în zona mamelonului şi a colului uterin.

Suptul. Stimularea mecanică a mamelonului determină creşterea cantificabilă a secreţiei ocitocinei la om şi la multe specii de mamifere. S-a demonstrat că, la om, în timpul suptului are loc disocierea secreţiei ocitocinei de cea a vasopresinei (40).

La majoritatea mamiferelor, lactaţia depinde şi de secreţia laptelui şi de expulsia lui. Reflexul de expulsie a laptelui implică un arc aferent prin care stimularea mamelonului iniţiază impulsuri nervoase care trec prin nervii periferici şi măduva spinării la hipotalamus şi se eliberează ocitocina din neurohipofiză. Ocitocina eliberată completează apoi arcul reflex contractînd celulele mioepiteliale care înconjură alveolele şi canaliculele şi astfel se expulzează laptele. Numeroşi factori centrali ca emoţia şi *stress*-ul pot interfera acest reflex inhibînd eliberarea ocitocinei. De asemenea agenţi farmacologici ca anestezicele, inhibă eliberarea ocitocinei.

Travaliul şi expulsia. Stimularea organelor genitale ale femeii prin distensie în timpul travaliului sau în timpul coitului determină eliberarea ocitocinei. Ocitocina maternă şi fetală (care traversează bariera fetoplacentară) are un rol în iniţierea travaliului la femeie. Deşi nu s-au observat tulburări majore ale travaliului la femei cu diabet insipid, totuşi rezerva de ocitocină nu este cunoscută în aceste cazuri (41).

3.1.3. METODE BIOLOGICE DE CANTIFICARE

Majoritatea metodelor folosite pentru biodozarea ocitocinei se bazează pe acţiunea asupra contracţiei uterine sau a mioepiteliului mamar (42). Sînt descrise metode *in vivo* la rozătoare şi la om şi metode *in vitro* pe uter izolat sau pe secţiuni de glandă mamară cu sensibilitatea de 50—250 μ U/ml.

Ambele metode sînt puţin specifice, efecte similare se pot obţine cu amine cerebrale (5-HT) sau cu alte peptide (angiotensina, AVP etc.). Ele sînt totuşi utile pentru testarea preparatelor farmaceutice.

Metoda expulsiei laptelui *in vitro* (43, 44), bazată pe timpul de latenţă a expulsiei laptelui observată la microscop pe fragmente de glandă mamară de şobolancă, oferă o sensibilitate pînă la 10^{-4} μ U de ocitocină per mililitru de plasmă *neprelucrată*. Metoda este însă laborioasă, nespecifică şi greu reproductibilă.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

3.1.4. METODA RIA PENTRU CANTIFICAREA OCITOCINEI

Măsurarea ocitocinei circulante nu este un simplu procedeu de rutină, concentraţia sa ca şi a celorlalte octapeptide retrohipofizare fiind foarte mică, ceea ce implică metode laborioase de extracţie. Maniabilitatea şi specificitatea metodelor RIA a stimulat cercetarea posibilităţilor de cantificare cu ajutorul sistemelor antigen-anticorp. Totuşi, numai trei grupuri posedă sisteme RIA bine caracterizate şi validate (45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52).

A. *Imunogenul*

Ocitocina necuplată. Ocitocină sintetică (Sandoz sau Parke Davis) cu activitate biologică de 450 UI/mg, pulbere pură se dizolvă în apă distilată şi se omogenizează în adjuvant Freund. Doza pentru un animal în schema de imunizare intradermică în multiple locuri este de aproximativ 100 μg, deci 45—50 UI (52).

Ocitocina cuplată la o proteină purtătoare (51). Ocitocină pulbere, pură, cu activitate de aproximativ 450 UI/mg (Sandoz sau Parke Davis) se dizolvă în apă acidulată cu HCl la pH = 3, pentru concentraţia de 1 mg/ml. Se poate conserva la —20°C peste un an şi poate fi folosită pentru prepararea imunogenului şi a trasorului.

Procedeul de cuplare cu glutaraldehidă: 20 mg de albumină serică bovină se amestecă cu 2 mg de ocitocină şi se dizolvă în 2 ml tampon fosfat 0,1 M, pH = 7,5. Se adaugă, picătură cu picătură cu agitare constantă, 1 ml glutaraldehidă 0,02 M.

Pentru a determina gradul de conjugare, se ia o probă din amestecul de reacţie şi se trece pe coloană de Sephadex G-25. Dacă cuplarea este bună, atunci ocitocina marcată cu ^{125}I, introdusă în reacţie, trebuie să apară o dată cu fracţiunea albuminică, iar la testarea imunoreactivităţii cu ser antialbumină în exces, ocitocina marcată apare în precipitat.

Se diluează amestecul de cuplare astfel încît să avem concentraţia de ocitocină de 40—50 UI/mg adică 0,1 mg/ml. Doi ml din conjugat se amestecă v/v cu adjuvant Freund, se omogenizează şi acest omogenat reprezintă o doză pentru un iepure.

Alte imunogene. Sînt descrise variante cu adsorbţie pe particule de cărbune, polivinil pirolidon etc., care nu prezintă avantaje speciale.

B. *Antiserul*

Imunizarea animalelor. Iepuri New Zealand, de preferat femele, sînt inoculate i.d. în pielea cefei şi spatelui, în 10 locuri, după depilare. După 14—20 de zile se reinoculează în acelaşi mod. Apoi se inoculează s.c. la intervale de cîte 2 săptămîni, dacă imunogenul este un conjugat şi intradermic, dacă ocitocina este necuplată. La fiecare 10 zile după fiecare inoculare se fac sîngerări test.

Selecţionarea animalelor. Dacă după primele 2—3 inoculări titrul la RIA nu trece de 1:10, adică antiserul diluat 1:10 nu leagă cel puţin 50% din ocitocina marcată, iepurele este eliminat. După 4—5 inoculări se reţin numai iepurii care dau titruri de peste 1:200. În final, sînt reţinute antiserurile cu titrul de cel puţin 1:1 000, cu specificitatea şi afinitatea dorită.

C. ^{125}I-*Ocitocina*

Ocitocina conţine în poziţia doi un nucleu tirozinic şi poate fi astfel iodurată prin procedeul clasic cu cloramină-T. Se pare că omisiunea agentului reducător (metabisulfitul de sodiu) (46) nu este necesară (52). La marcarea cu ^{125}I se obţin activităţi specifice pînă la 1 000 μ Ci/μg.

Iodurarea. Un protocol de iodurare care a dat bune rezultate (52) este următorul:

La 2—5 μg ocitocină sintetică pulbere cu bioactivitate de 450 UI/mg dizolvată în 2 μl tampon acetat de sodiu 0,01 M, pH = 3,9, se adaugă 2 mCi ^{125}INa într-o fiolă de sticlă siliconată sau într-o eprubetă de plastic, apoi 5 μl de tampon Tris-HCl 0,05 M, pH = 8,0 care conţine 12,5 μg cloramină-T. Agitare bruscă şi scurtă (5—10 secunde) şi amestecul este turnat într-o eprubetă de sticlă care conţine 25 ml tampon Tris-HCl 0,05 M cu 25 μg metabisulfit de sodiu.

Purificarea. Se adaugă 2 g Dowex (răşină schimbătoare de ioni 2×8,50—100 mesh). Eprubeta se astupă şi se agită. Se lasă să stea. În momentul în care răşina s-a depus, supranatantul care conţine ^{125}I-ocitocină este prelevat, împărţit în porţii de cîte 0,5 ml şi conservat la —20°C pînă la folosire. Un preparat bun durează pînă la 3 luni.

Purificarea se poate face şi prin cromatografie pe Sephadex G-25 fin. În acest caz, amestecul de iodurare este diluat în numai 2 ml tampon Tris-HCl 0,05 M, cu 25 μg metabisulfit de sodiu. După tratarea cu Dowex, supranatantul se aplică pe o coloană cu patul de 200/20 sau de 400/10 mm şi se eluează cu acelaşi tampon. Se colectează fracţiuni de aproximativ 2—4 ml, în funcţie de coloana folosită, şi se citeşte radioactivitatea.

Tratarea prealabilă a amestecului de iodurare cu *Dowex* este *esenţială* deoarece *modul de eluţie al iodurii libere şi al ocitocinei marcate pot fi foarte asemănătoare.*

Pentru a urmări migrarea, în amestecul de marcare se poate adăuga 100 μl plasmă umană şi albastru de bromfenol. În primii 10—20 ml care vin o dată cu proteina colorată se află radioactivitatea corespunzătoare ocitocinei degradate şi agregatelor. În următorii 20—60 ml de efluent apare ocitocina marcată dar şi iodura liberă dacă n-a fost îndepărtată complet cu Dowex. Tratînd ocitocina marcată din acest al doilea val cu puţin amberlit CG-400, se poate îndepărta iodura liberă.

Cu peptidele mici, filtrarea pe gel de Sephadex permite separarea moleculelor marcate de cele rămase nemarcate, sporind astfel sensibilitatea sistemului (46, 47, 52). Anume, peptidul nemarcat apare înaintea peptidului marcat iar panta ascendentă a peptidului marcat poate să interfereze cu cea descendentă din picul peptidului nemarcat. Baza fizico-chimică a acestei separări nu este cunoscută, deşi este probabil că ea depinde de absorbţia diferenţiată a peptidului marcat şi nemarcat pe matricea gelului (52).

Rezultă că eluatele cel mai bine asigurate sînt cele ale pantei descendente a picului dat de peptidul marcat, imediat după eluatul cu activitate maximă.

Verificarea purităţii: se face prin cromatoelectroforeză pe benzi de hîrtie Whatman 3 MC sau 3 MM, de 25/4 cm, la voltaj constant de 500 V, timp de 45 minute (53). Benzile se usucă, se taie în felii de cîte 1 cm începînd cu 2 cm înapoia originii şi se citeşte radioactivitatea. Picul cel mai rapid, care trece de centrul hîrtiei este iodura liberă, iar peptidul marcat este între el şi

Scanned with OKEN Scanner

origine (52) (fig. II.3.2.); o cantitate mică de radioactivitate rămasă la origine reprezintă probabil peptid degradat.

Verificarea purității se poate face și prin electroforeză pe acetat de celuloză.

Calculul randamentului și al activității specifice se face cu ajutorul formulei:

$$\frac{\text{Total p/m } ^{125}\text{I-O}}{\text{Total p/m}} \times 100 = \text{randamentul sau procentul încorporării izotopului}$$

în peptid, unde total p/m ^{125}I-O reprezintă suma impulsurilor pe secțiunile de bandă care corespund picului ocitocinei marcate iar total p/m este suma impulsurilor pe întreaga bandă.

$$AS = \frac{\text{randament} \times \text{activitatea totală a izotopului}}{\text{cantitatea de peptid}} = \mu Ci/\mu g$$

De exemplu, randamentul este de 60% deci 0,6, s-a lucrat cu 2 mCi (2 000 μCi) de ^{125}I Na și 2 μg de ocitocină, atunci:

$$AS = \frac{0{,}6 \times 2\,000}{2} = 600\ \mu Ci/\mu g.$$

Apoi se calculează concentrația peptidului în preparatul purificat, folosind datele de mai sus.

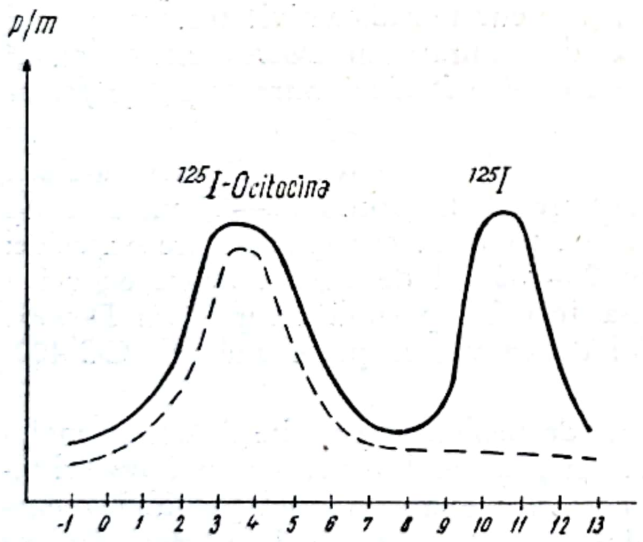


Fig. II.3.2. Cromatoelectroforeza amestecului de marcare (linie plină) și a ocitocinei marcată și purificată cu Dowex (linie întreruptă) (referința 52).

Imunoreactivitatea trasorului se verifică incubînd aproximativ 100 pg de ^{125}I-Ocitocină timp de o oră în prezența și în absența unui exces de anticorp. După separarea complexelor legate, se calculează procentul legării în ambele condiții.

Criteriile purității unui preparat adecvat de ^{125}I-Ocitocină sînt:

— randamentul inițial al iodurării mai mare de 50%;

— conținutul în iodură al preparatului purificat să fie sub 5%; dacă este mai mare, se repurifică;

— legarea netă la anticorp să treacă de 60%.

D. *Standardul*

Preparatul folosit este al 3-lea standard internațional, dar poate fi folosit orice preparat de sinteză pur cu activitate de 400—500 UI/mg. Rezultatele sînt exprimate în termeni de greutate și de aceea se face conversiunea unităților biologice în unități de masă.

Peptidul sintetic este conservat fie ca pulbere în exicator, fie ca soluție de 1 mg/ml în tampon-acetat de sodiu 0,01 M, pH=3,9, la +4°C, putînd dura astfel cîțiva ani.

Scanned with OKEN Scanner

De reţinut că un preparat peptidic sintetic nu este sinonim cu puritatea absolută; el poate fi contaminat cu peptide greşite, cu polimeri şi fragmente peptidice care pot fi detectate prin cromatografia în strat subţire (52).

E. *Probele biologice*

Recoltarea. Majoritatea peptidelor mici sînt expuse degradării sub acţiunea enzimelor prezente în sînge (52). Plasma recoltată de la femei spre sfîrşitul perioadei de gestaţie este în mod special nocivă pentru ocitocină din cauza concentraţiei mari a unei enzime cunoscută sub diferite nume (ocitocinază, cistinaminopeptidază), care distruge rapid hormonul (52). De aceea, se recomandă unele precauţii la recoltarea sîngelui. Unul dintre procedee (52) constă din centrifugarea la rece a sîngelui la cîteva minute după recoltare, separarea şi acidificarea plasmei, adăugînd 0,2 volume de HCl M, care inhibă complet enzima. Alt procedeu (51) prevede adăugarea, imediat după colectare, a fenantrolinei în cantitate de 5 μg/ml sînge total.

Condiţiile de colectare a urinii sînt mai puţin riguroase. Dacă urina este sterilă, ocitocina rămîne stabilă mai multe zile (52).

Conservarea se face prin congelare; nu este permis să se decongeleze probele înainte de a fi prelucrate. Temperatura optimă este —70°C dar se pot folosi şi congelatoare pentru —20°C. Uneori, plasma acidifiată se gelifică dacă congelarea se prelungeşte mai multe săptămîni, de aceea se recomandă să fie prelucrată în cîteva zile după recoltare. Plasma de la animale sau de la femei în afara sarcinii se poate conserva neacidulată, cu condiţia să fie introdusă în congelator cel mai tîrziu la 30 de minute după prelevare (52).

Prelucrarea probelor. Sîngele şi urina sînt supuse procedurilor de extracţie şi purificare cu scopul principal de a concentra ocitocina. Justificarea prelucrării este multiplă şi anume:

— concentraţia redusă a hormonului în lichidele biologice;

— prezenţa enzimelor proteolitice în plasmă;

— concentraţia mare a sărurilor şi ureei în urină, care pot inhiba reacţia antigen-anticorp.

Criteriile selecţiei unui procedeu de extracţie adecvat au fost stabilite pornind de la rezultatele practice (52).

— Metoda trebuie să fie rapidă, simplă, de mare randament. Cu cît este mai simplă, cu atît este mai reproductibilă.

— Hormonul trebuie să fie concentrat într-un volum mai mic decît cel al probei iniţiale, ceea ce permite ameliorarea sensibilităţii.

— Procedeul nu trebuie să concentreze, nici inhibitori nespecifici, nici enzime proteolitice.

— Recuperarea trebuie să fie mai mare de 50% şi să fie reproductibilă: de exemplu, este de preferat o recuperare de 60% cu un coeficient de variabilitate de $\pm$10% decît o recuperare de 95% cu un coeficient de variabilitate de $\pm$30%.

— Recuperarea trebuie să fie uniformă pentru toată gama de concentraţii predictibile.

— Diluţii seriate din extract trebuie să dea o curbă paralelă cu cea a preparatului standard. Prezenţa paralelismului nu garantează identitatea, dar absenţa lui o infirmă.

— Substanţele folosite pentru execuţie trebuie să fie uşor de procurat şi să nu varieze de la un lot la altul.

Scanned with OKEN Scanner

Principalele procedee folosite pentru extracţia ocitocinei din plasmă sînt: precipitarea cu eter-acetonă (46, 51), adsorbţia pe pămînt Fuller (49), precipitare cu eter-acetonă şi ultrafiltrare (54) şi adsorbţie pe granule de sticlă (52). Procedeul cu granule de sticlă este folosit şi pentru concentrarea ocitocinei din urină (55).

Validarea procedeului de concentrare se face prin proba de recuperare cu ajutorul ocitocinei marcate adăugată probei biologice supusă extracţiei.

Eventualele modificări ale structurii hormonului în cursul procedurilor de extracţie pot fi identificate prin metode fizico-chimice ca de exemplu o combinaţie de filtrare în gel cu cromatografia în strat subţire (52).

F. *Incubarea reactivilor*

În general, caracteristicile unui sistem RIA depind de concentraţia reactivilor, nu de cantitatea lor absolută.

Deoarece probele sînt supuse procedurilor de extracţie pentru a concentra hormonul, este necesar să folosim volume de incubare mici. De exemplu un volum final de incubare 100 µl este de 10 ori mai sensibil decît un volum de incubare de 1 000 µl. O schemă a volumelor adăugate poate fi următoarea: 50 µl probă, 50 µl antiser şi 10 µl trasor.

G. *Separarea hormonului legat de cel liber*

Aceasta se face printr-una din tehnicile uzuale: dublu anticorp, sulfat de amoniu, alcool, electroforeză, cărbune-dextran etc.

H. *Performanţele sistemului RIA*

Experienţele de fiabilitate au ca adresă specificitatea, sensibilitatea, precizia şi exactitatea.

Specificitatea. Sistemul RIA nu este perturbat de substanţele care interferează dozarea biologică a ocitocinei. Testarea specificităţii se face pentru cele două peptide înrudite vasopresină şi vasotocină. Într-un sistem RIA cu antiser adecvat, vasopresina interferează la concentraţii de 1 000 de ori mai mari decît a ocitocinei (52), ceea ce înseamnă că, practic, cele două peptide nu pot fi confundate. Interferenţa ocitocină-vasotocină este puţin studiată în sisteme RIA.

Sensibilitatea este dictată de afinitatea antiserului. Pînă în prezent nu s-a putut depăşi un prag de sensibilitate de 10—20 pg/ml (52).

Precizia globală a sistemului RIA este greu de apreciat deoarece curba doză răspuns nu este liniară, eroarea fiind mai mare la concentraţii mari. Eroarea exprimată prin coeficientul de variabilitate intra- şi interserii este de acelaşi ordin ca şi pentru alte sisteme adică 5—10% şi respectiv 10—15%.

Exactitatea. Admiţînd că ocitocina endogenă este identică cu preparatul standard sintetic, exactitatea nu ridică nici o problemă. Totuşi, sistemul RIA măsoară o secvenţă de numai trei din opt aminoacizi care alcătuiesc *situs*-ul antigenic dar care nu reprezintă molecula în întregime. S-ar putea deci ca sistemul de dozare să cantifice fragmente ale hormonului rezultate ale proteolizei sau metabolismului în ficat sau în rinichi. De aceea se recurge şi la metodele biologice care pot evidenţia disocierea dintre hormonul intact şi fragmentele sale. În cazul ocitocinei, activitatea biologică depinde de integritatea moleculei şi în special de integritatea structurii inelului peptidic.

I. *Trusele RIA*

Reactivii RIA pentru ocitocină sînt parţial disponibili pe cale comercială şi anume ocitocină pură adecvată pentru prepararea imunogenului,

Scanned with OKEN Scanner

pentru radioiodurare şi ca standard şi antiser; ocitocină marcată sau truse RIA complete nu sînt încă înscrise în cataloagele cu produse radioimunochimice.

3.1.5. APLICAŢII ŞI REZULTATE

A. *Fiziologie*

Nu se cunosc nivelurile ocitocinei *circulante* la om în condiţii bazale, deoarece în marea majoritate aceste concentraţii sînt sub limita de detectare a metodei, adică sub 10—20 pg/ml. Eliberarea caracteristică a ocitocinei se face sub forma unei serii de descărcări; se consideră că este mai probabil ca frecvenţa acestor descărcări să aibă semnificaţie fiziologică, nu valoarea absolută a concentraţiei (52). Acest concept s-a dovedit util în analiza rezultatelor obţinute în cursul sarcinii la om (56).

În *urină*, concentraţia ocitocinei variază de la valori nedetectabile la 100 pg/ml (55).

Cele trei situaţii fiziologice în care eliberarea ocitocinei este crescută sînt: lactaţia, travaliul şi activitatea sexuală.

În lactaţie, eliberarea ocitocinei poate lipsi, fără ca procesul lactaţiei să sufere.

La om, eliberarea ocitocinei în timpul actului sexual este inconstantă (52).

Concluziile actuale asupra rolului ocitocinei în cursul travaliului la om sînt următoarele:

— în timpul travaliului apar descărcări ale ocitocinei, cu o frecvenţă care creşte pe măsură ce se apropie expulsia;

— concentraţia cea mai mare este observată în timpul expulsiei prin vagin, cea mai mică în timpul operaţiei prin cezariană cînd parturienta nu este în travaliu şi valori intermediare cînd operaţia cezariană se practică în timp ce parturienta este în travaliu;

— şi hipofiza fătului eliberează ocitocină iar nivelul în sîngele fetal este mai mare decît în sîngele matern (57, 58); rezultă că ocitocina face parte din complexul de factori materni şi fetali care concură la declanşarea travaliului spontan (52).

B. *Patologie*

Nu există încă date de observaţie care să ateste legătura dintre concentraţia ocitocinei şi o anumită stare patologică (52). În diabetul insipid, în care ar fi de aşteptat o insuficienţă nu numai a vasopresinei dar şi a ocitocinei, nu au fost observate perturbări în cursul travaliului.

A fost semnalat un singur caz cu secreţie ectopică de ocitocină asociată cu un proces tumoral (59).

3.2. VASOPRESINA

3.2.1. INTRODUCERE

Vasopresina este sintetizată la om sub forma chimică de arginin-8-vasopresină (AVP) cunoscută şi sub denumirea de hormon antidiuretic (ADH).

A. *Locul de sinteză, stocarea şi natura* chimică au fost expuse în paginile precedente (paragraf 3.1.).

Scanned with OKEN Scanner

B. *Rolul fiziologic*

Transportul apei şi al electroliţilor. Rolul major al vasopresinei (AVP) este controlul reabsorbţiei apei în tubii contorţi distali şi în tubii colectori din rinichi. Mecanismul prin care vasopresina stimulează reabsorbţia apei şi ca urmare, concentrarea urinii, implică intervenţia adenilciclazei şi a cAMP. Pe lîngă rolul său în transportul apei, AVP poate influenţa, în anumite situaţii, şi transportul electroliţilor.

Vasoconstricţia. Primele date asupra funcţiei AVP se referă la acţiunea presoare (2). Doze mari (farmacologice) de vasopresină produc contracţia muşchilor netezi. Efectul de contracţie asupra patului vascular splanhnic a fost utilizat pentru a stăpîni hemoragia tractului gastrointestinal superior de exemplu în varicele esofagiene, dar rezultatul nu este totdeauna satisfăcător şi pot apărea complicaţii cardiace cu bradicardie (41). Doze fiziologice de AVP au acţiune presoare numai la pacienţi cu insuficienţă retrohipofizară. În circulaţia fetală există niveluri mari de AVP în timpul travaliului (60), a căror semnificaţie nu este bine cunoscută; se ştie însă că circulaţia ombilicală este sensibilă la efectul vasoconstrictor al AVP.

Releasing-factor de ACTH. Acţiunea de eliberare a ACTH direct sau prin stimularea CRF constituie încă obiect de studiu. Unele date ca de exemplu prezenţa unor concentraţii de AVP mult mai mari în vasele porte hipofizare decît în circulaţia generală par să pledeze pentru acţiunea directă la nivelul hipofizei anterioare, ceea ce a dus la ideea că are funcţie de CRF.

Acţiunea asupra SNC. În ultimul deceniu, s-a stabilit că AVP este implicată în procesele de memorie în special şi mai puţin în procesul de învăţare (61).

C. *Reglare şi control*

Modificări ale osmolarităţii sîngelui, ale volumului sanguin şi factorii psihogeni sînt principalele trei categorii de stimuli care controlează eliberarea AVP.

Osmoreceptori care mediază răspunsul osmolar sînt localizaţi în hipotalamus. Receptorii fluctuaţiilor de volum par localizaţi în auriculul stîng, în baroreceptorii arcului aortic şi în sinusul carotidian. Impulsurile aferente din aceşti receptori trec prin vag, nervii glosofaringieni şi aortici şi ajung la diencefal unde produc o scădere a secreţiei vasopresinei. Secţionarea acestor nervi duce la creşterea AVP. Creşterea osmolarităţii asociată cu scăderea volumului sanguin duc la creşterea AVP şi la activarea sistemului renină-angiotensină. Stimuli psihogeni ca durerea produc antidiureză.

Sînt semnalate multiple interacţiuni ale AVP cu substanţe bioactive şi cu mediatori chimici la nivelul circulaţiei sistemice. Acetilcolina, nicotina, agoniştii betareceptorilor, bradikinina stimulează eliberarea AVP pe cînd agoniştii alfa şi atropina o inhibă. Este citat şi alcoolul printre inhibitorii AVP.

Eliberarea AVP din neurohipofiză poate fi considerată ca ramura eferentă a unui arc reflex neuroendocrin (62).

3.2.2. METODE DE CANTIFICARE

Efectele antidiuretice, presoare şi de creştere a permeabilităţii pielii şi mucoaselor sînt folosite pentru construirea unor modele biologice pentru cantificarea vasopresinei *in vivo* şi *in vitro*.

Scanned with OKEN Scanner

A. *Metode biologice in vivo*

Testul antidiuretic la şobolan a fost introdus în 1928 (63) şi de atunci a fost mereu perfecţionat (62, 64, 65). Astăzi, acest test oferă o sensibilitate de ordinul a 2—5 μU (62), deşi sînt autori care obţin un prag de sensibilitate şi mai coborît, dar variabilitatea de răspuns a animalelor nu permite generalizări.

Testul presor este aplicat ca o metodă standard pentru măsurarea vasopresinei, prin acţiunea sa presoare la şobolanul pretratat cu un blocant adrenergic (66, 67). Metoda este folosită pentru standardizarea produselor de vasopresină înscrise în farmacopee. Sensibilitatea tehnicii este de 1 mU (62) în termeni de unul din standardele internaţionale: USP — Standard de referinţă din hipofiza posterioară sau Al III-lea Standard Internaţional. Sînt autori care au obţinut o sensibilitate ameliorată a tehnicii (68). Totuşi, testul nu este suficient de sensibil pentru măsurarea vasopresinei în plasmă, de aceea se recurge la procedee de extracţie şi de concentrare a vasopresinei (62).

B. *Metode biologice in vitro*

Acestea se bazează pe acţiunea vasopresinei de creştere a permeabilităţii. Este de reţinut testul vezicii de broască (69) cu un prag de sensibilitate de aproximativ 50 μU/ml, bazat pe efectul hidroosmotic.

3.2.3. RADIOIMUNOANALIZA VASOPRESINEI

Metodele biologice deşi lipsite de specificitate, expuse variabilităţii de răspuns a preparatelor biologice şi laborioase, nu pot fi abandonate. Ele servesc în continuare cercetărilor de farmacologie şi pentru validarea sistemelor RIA, ale căror antiseruri nu disting totdeauna octapeptidele cu structuri similare (fig. II.3.1).

Metoda RIA pentru AVP este o metodă dificilă care necesită atenţia permanentă a unui cercetător experimentat în domeniul RIA şi, spre deosebire de alţi hormoni, nu este accesibilă încă pentru un laborator de rutină (70).

A. *Imunogenul*

AVP sau LVP naturală sau de sinteză emulsionată în adjuvant a permis obţinerea unor antiseruri adecvate pentru RIA (71, 72).

AVP sau LVP naturală sau de sinteză este cuplată cu albumină serică bovină sau umană, cu gamaglobulină de cal, cu imunoglobulină umană A (IgA), cu tiroglobulină printr-una din tehnicile de conjugare cunoscute (73). Antiserurile obţinute conţin anticorpi specifici pentru structura AVP (72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84).

B. *Antiserul*

Pentru obţinerea antiserurilor sînt folosite imunizările repetate cu AVP sau LVP în doze de 0,1 mg/animal/injecţie. Deşi primele antiseruri folosite în RIA au fost obţinute cu preparate relativ impure, cu activitate biologică de aproximativ 120 U/mg (80), în ultimii ani sînt preferate preparatele foarte purificate (80), cu activitate biologică de 350 U/mg (Schwarz/Mann — S.U.A.) sau 400—450 U/mg (Hoechst Co., Sandoz sau Parke-Davis).

Animalul folosit cel mai frecvent pentru imunizare este iepurele, deşi sînt folosite şi capra sau cobaiul.

Antiserurile obţinute prin imunizare cu LVP au o afinitate mai redusă pentru AVP decît pentru LVP. De aceea, ţinînd seama că, la om, hipotalamusul sintetizează AVP şi în plus, concentraţia plasmatică este foarte redusă, de ordinul a 1—10 pg/ml adică 10^{-11}—10^{-12} M, este necesar ca antiserul să

Scanned with OKEN Scanner

conţină anticorpi cu mare afinitate, ştiut fiind că sensibilitatea tehnicii este dependentă de constanta de afinitate (sensibilitatea $=\frac{1}{K}$). Antiseruri capabile să detecteze concentraţii de AVP de 0,5 —1 pg/ml au fost obţinute numai de cîteva grupuri (72, 76, 77, 79, 80, 82, 84).

Specificitatea strictă pentru AVP este greu de realizat, întrucît structura celor trei octapeptide cunoscute la om (ocitocina, AVP şi AVT) este foarte asemănătoare (fig. II.3.1.). Au fost obţinute totuşi antiseruri care disting AVP de ocitocină şi altele care disting şi AVT (79).

Caracterizarea antiserurilor implică stabilirea concentraţiilor la care pot interfera alte octapeptide, inclusiv cele de animal întrucît sistemul RIA pentru AVP, ca şi al ocitocinei, pot fi folosite şi pentru alte specii (80). Cele mai bune antiseruri au titrul iniţial de peste 1:50 000 (80).

Neurofizina nu influenţează sistemul RIA (70).

C. *Marcarea AVP cu* ^{125}I

AVP pură naturală (86) sau de sinteză cu activitate biologică peste 300 U/mg este marcată cu ^{125}I prin metoda cu cloramina-T. Modificările aduse acestei metode privesc mai ales modul de întrerupere a reacţiei cu metabisulfit de sodiu, care este înlocuit cu plasmă sau cu albumină serică umană. Se pare totuşi că nu metabisulfitul determină neomogenitatea cromatografică a preparatului iodurat ci puritatea AVP folosită pentru marcare, preparatele mai puţin pure conţinînd concentraţii variabile de peptide greşite rezultate din procesul de sinteză.

Marcarea. Un exemplu de procedeu tipic (70) este următorul: se adaugă succesiv în fiola de marcare 25 µl tampon fosfat de sodiu 0,3 M, pH=7,4, 600 µCi ^{125}I, 1 µl de AVP (10 µg/µl în 0,2 N acid acetic), 10 µl de cloramină-T (preparată proaspăt la concentraţia de 4 µg/µl apă) şi 100 µl albumină serică umană (250 µg/µl în tampon-fosfat). Se obţin astfel activităţi specifice de 50—200 µCi/µg.

Purificarea ^{125}I*-AVP* se face prin tratare imediată cu Dowex 2×8, 50—100 mesh şi repurificarea pe Sephadex G-25 fin. Peste amestecul de marcare diluat în 2 ml de acid acetic 0,2 M sau în tampon Tris-HCl 0,05 M, pH=8 se adaugă 2 g Dowex şi se agită. Se lasă să sedimenteze. O porţiune din supranatant este trecută pe o coloană de 1×20 cm sau 1×40 cm de Sephadex G-25 fin echilibrat, fie cu acid acetic 0,2 M, fie cu tampon Tris-HCl 0,05 M, pH=8. Se culeg fracţiuni de 1—4 ml (în funcţie de mărimea patului coloanei). Albumina iodurată apare odată cu void-volumul, apoi apare ^{125}I-AVP şi iodura liberă, care n-a fost reţinută pe răşină. AVP neiodurată eluează puţin înaintea AVP iodurate, de aceea eluatele pantei ascendente şi ale piscului se elimină, întrucît conţin AVP neiodurată. AVP iodurată apare cu eluatele pantei descendente a picului de ^{125}I-AVP şi se colectează pentru a fi folosite.

^{125}I-AVP monoiodurată este neomogenă, fiind contaminată cu AVP nemarcată şi cu ^{125}I-AVP diiodurată. Afinitatea antiserurilor se pare că este maximă pentru AVP nemarcată şi scade cu 30% pentru ^{125}I-AVP monoiodurată. Purificarea pe Sephadex creşte activitatea specifică pînă la 2 000 µCi/kg ^{125}I-AVP (70, 80).

Preparatul de ^{125}I-AVP purificat se păstrează diluat în acid acetic 0,2 M, prin congelare la —20°C rămînînd stabil timp de 4—6 săptămîni (70).

Verificarea purităţii ^{125}I*-AVP* se face prin cromatografie ascendentă sau descendentă în sistem butanol-acid acetic-apă (4:5:1 v/v) (70).

Scanned with OKEN Scanner

Altă metodă este cromatoelectroforeza (80) pe benzi de hîrtie Whatman 3 MM (3 MC) sau Toyo 514, în tampon-fosfat 0,67 M, pH=7; la 10—20 µl de amestec de marcare sau de eluat se adaugă 50 µl plasmă umană normală colorată cu albastru de bromfenol şi se aplică un curent de 600 V. ^{125}I-AVP rămîne la origine, hormonul degradat migrează cu colorantul, iar iodura liberă trece dincolo de colorant (80).

Verificarea purităţii se face şi prin calculul legării ^{125}I-AVP la anticorpul specific în prezenţa unui exces de antiser. Un preparat bun dă o legare de 80—99%, cînd în sistemul RIA se adaugă 1—2 pg de ^{125}I-AVP cu o radioactivitate de aproximativ 2 000 p/m.

D. *Preparatul de referinţă*

Rezultatele RIA pentru AVP sînt exprimate în termeni de masă sau de unităţi biologice raportate la preparatele standard internaţionale.

Standardele internaţionale pentru AVP şi ocitocină sînt utilizabile şi pentru bio- şi pentru imunodozare. O unitate internaţională de extract de retrohipofiză este definită ca acea cantitate de ocitocină sau de vasopresină conţinută în 0,5 mg din preparatul standard în uz. În termeni de unităţi internaţionale, 1 mg de ocitocină pură de *sinteză* are o activitate ocitocică de 450 UI, sau invers, 1 UI reprezintă activitatea ocitocică din 2,2 g de ocitocină pură de sinteză; 1 mg de AVP pură de sinteză are o activitate presoare de 400 UI, sau invers, 1 UI reprezintă activitatea presoare sau antidiuretică din 2,5 µg AVP pură (86).

Au fost elaborate trei preparate standard internaţionale: I, II şi III. Al treilea standard are o activitate de 2,0 UI/mg adică UI=0,5 mg din substanţa sub formă de pulbere distribuită gratuit de OMS prin The National Institute for Medical Research, Mill Hill, Londra NW7, sub formă de fiole cu un conţinut de aproximativ 30 mg. Fiola cu standard poate fi conservată indefinit ca atare la —20°C, la *întuneric*. Se mai foloseşte şi un alt preparat: USP Posterior Pituitary Reference Standard care se poate obţine de la USP Reference Standards, 46 Park Avenue, New York, N. Y. 10016. Acesta este livrat sub formă de pulbere de retrohipofiză bovină 100 mg/fiolă. Activitatea lotului „J" din acest preparat conţine 2,4 unităţi ocitocice/mg şi 2,1 unităţi vasopresoare sau antidiuretice/mg (86).

Al treilea preparat internaţional şi USP Posterior Pituitary Reference Preparation conţine activităţi echivalente şi anume 2 UI/mg de activitate ocitocică şi presoare (sau antidiuretică) din primul corespund cu 2,4 UI/mg activitate ocitocică şi cu 2,1 UI/mg activitate vasopresinică din al doilea. Practic însă, pot fi considerate echivalente.

Standardele de lucru sînt preparate de pulbere de hipofiză posterioară obţinute în laborator sau pe cale comercială şi produse de sinteză calibrate faţă de unul din cele două preparate de referinţă internaţionale.

Curba standard se prepară folosind ca diluent plasmă umană fără vasopresină. Curba se construieşte cu concentraţii progresive de la 0,05 la 20 pg/ml.

E. *Probele biologice*

Ţesuturile, plasma şi urina sînt supuse în prealabil operaţiilor de extracţie a AVP.

Extractele de ţesut. Hipofiza posterioară şi ţesutul tumoral proaspete, congelate sau liofilizate sînt tratate cu acid acetic şi extractul obţinut este neutralizat cu NaOH. Cînd este necesar, se poate obţine AVP purificată

Scanned with OKEN Scanner

prin cromatografie pe Sephadex G-25 fin echilibrat cu acetat de amoniu 0,2 M, pH=4,0. Dacă AVP se găseşte în extract în cantitate suficient de mare, atunci se construieşte o curbă cu diluţii progresive, care se foloseşte pentru testul paralelismului cu curba preparatului de referinţă.

Plasma. Sîngele colectat în cupe răcite şi heparinate este centrifugat imediat la 4°C cu grijă să nu apară hemoliză, deoarece hematiile hemolizate pun în libertate enzime care degradează AVP. Pentru extracţia şi concentraţia AVP se folosesc o varietate de metode: cromatografia pe coloană de Sephadex G-25 fin, extracţie cu acetonă urmată de cromatografie pe Sephadex G-25 fin sau extracţie cu acetonă, cu condiţia ca antiserul să aibă afinitate foarte bună pentru AVP (70, 87), adsorbţie pe Florisil şi spălare cu acetonă-acid acetic (78), extracţie cu acetonă şi delipidare cu eter de petrol (80) etc.

Diferitele variante folosite au ca scop simplificarea procedeului şi reducerea volumului iniţial de sînge colectat.

Urina poate fi folosită ca atare sau după concentrare printr-una din tehnicile folosite pentru plasmă (70).

F. *Incubarea reactivilor*

Sînt descrise sisteme cu volum total de 100—1 000 µl. Cînd probele biologice sînt folosite sub forma extractelor în acetonă se aduc corecţiile necesare pentru concentraţia crescută de NaCl (70). Incubarea se face la 4°C timp de 1—6 zile, în funcţie de afinitatea antiserului (80).

G. *Separarea complexelor de AVP marcată liberă*

Separarea se face printr-una din metodele uzuale: dublu anticorp, polietilenglicol, cărbune-dextran (70), talc sau cromatoelectroforeză.

H. *Performanţele sistemului RIA*

Sensibilitatea este de 0,5—1 pg/ml.

Specificitatea: un sistem RIA cu anticorpi cu afinitate mare pentru structura AVP detectează 0,5—20 pg/ml de extract de plasmă, dar nu diferenţiază concentraţii similare de LVP sau de AVP naturală. Interferenţa ocitocinei şi mai ales a vasotocinelor este caracteristică pentru fiecare antiser. Sînt descrise sisteme RIA care fac distincţia între aceste structuri (79).

Precizia exprimată ca variabilitate intraserie şi interserii se situează în jurul unui coeficient de variabilitate (CV), de 15 şi respectiv 20%.

I. *Truse RIA pentru AVP*

Nu sînt încă disponibile în circuitul comercial truse RIA complete. Reactivii pot fi procuraţi de la diferite case producătoare de reactivi biologici naturali şi de sinteză, pentru preparatul destinat marcării, sau producătoare de reactivi imunochimici pentru ser anti-AVP.

3.2.4. APLICAŢII CLINICE ŞI REZULTATE

Concentraţia AVP poate fi măsurată prin RIA în plasmă, în urină şi în tumori secretoare de AVP. Semnificaţia fiziologică a AVP în urină este incertă şi concentraţia variază, cum este de aşteptat, cu starea de hidratare.

A. *Pregătirea pacientului*

La normali, secreţia AVP corelează strîns cu volumul şi cu osmolaritatea plasmatică. De aceea este esenţial să se cunoască starea metabolică a pacientului în momentul prelevării (88). Cu 7 zile înainte de prelevare se

Scanned with OKEN Scanner

întrerupe orice medicaţie care influenţează secreţia AVP ca de exemplu: diuretice, hipnotice, alcool, opiacee.

Sîngele este recoltat înainte şi/sau după ce pacientul stă în poziţie verticală timp de 30 minute.

Urina este transferată imediat după emisie, în vase de plastic (pentru transport) sau de sticlă în care se adaugă cîte 1 ml de HCl N pentru fiecare 5 ml de urină. Un volum de 10—15 ml de urină este suficient. Urina este congelată imediat la —20°C. La pacienţii cu diabet insipid se recoltează urina pe cîte 2 ore (corect notate) înainte şi după 18 ore de sete şi inaniţie (sînt exceptate dulciurile). Proba se întrerupe înainte de 18 ore dacă greutatea corporală scade cu 5% sau peste. Pentru diagnosticul de secreţie „inadecvată" de AVP, urina pe 1—2 ore este colectată dimineaţa de preferinţă, iar proba de plasmă pentru determinarea osmolarităţii este recoltată la jumătatea intervalului (89).

B. *Transportarea probelor biologice*

Transportarea la distanţă se face sub formă congelată. Buletinul de însoţire conţine:

— date asupra osmolarităţii plasmei, concentraţia Na, K şi ureii, precum şi medicamentele ingerate etc.;

— date asupra modului de colectare a probelor;

— date cu privire la osmolaritatea plasmei şi urinii în momentul recoltării.

C. *Indicaţii clinice pentru RIA-AVP*

Acestea nu sînt suficient de clare, întrucît determinările AVP pot fi substituite cu o bună osmometrie a probelor recoltate sub control clinic corect pentru diagnosticul diabetului insipid şi pentru diagnosticul diferenţial între diabetul insipid hipofizar şi cel nefrogen prin proba de răspuns renal la AVP (88). Indicaţia pentru RIA-AVP este necesară numai în cazuri excepţionale, în care osmometria a dat rezultate echivoce (88).

D. *Rezultate*

Informaţii asupra concentraţiei AVP în plasmă în diferite situaţii fiziologice şi patologice au fost obţinute prin metode biologice şi prin RIA; rezultatele concordă şi sînt numeric echivalente (41).

Condiţii fiziologice. În tabelul II.3.1 sînt prezentate concentraţiile AVP obţinute prin RIA la normali. Sînt semnalate fluctuaţii intraindividuale de la o zi la alta în limite de la 1,4 la 4,6 pg/ml la normali studiaţi longitudinal

Tabelul II.3.1.

Concentraţia AVP în plasmă la normali în condiţii bazale şi sub influenţa stimulilor fiziologici (referinţa 41)

AVP — RIA (pg/ml)	Stimulare prin	Referinţa
1—5	Condiţii bazale	(41)
2,7—5,3	*Hidratare normală* hidratare parţială	(70, 91, 92)
1,4—4,0	*Încărcare cu apă* diureză apoasă	(70, 92, 93)
5,3—5,4	*Privare de apă* 16—24 ore	(70, 85, 94) (92, 93)
5,7—17,9	12 ore	

Scanned with OKEN Scanner

timp de 6 zile (89), ingestia de sodiu fiind incriminată în mecanismul acestor variaţii intraindividuale.

Spre deosebire de ocitocină, eliberarea AVP pare să fie continuă. Se semnalează totuşi că eliberarea nocturnă a AVP are un aspect pulsatil, episodic, variabil de la o noapte la alta la acelaşi subiect. Nu par să coreleze valorile AVP cu concentraţia sodiului în plasmă, cu stadiul somnului sau cu un anume interval al nopţii (90).

Probe dinamice: au fost propuse mai multe teste de exemplu la administrarea nicotinei (78, 79, 85), la hipotensiune (70), deshidratare (93), efort (93).

Efectul de creştere a concentraţiei AVP în poziţia verticală semnalat de unii autori este destul de slab (93).

Patologie. În diabetul insipid hipotalamic la pacienţi cu ingestie de lichide *ad libitum*, osmolaritatea plasmei în condiţii bazale este de $295 \pm 5{,}8$ Osmol/kg corp, iar concentraţia AVP este de $0{,}8 \pm 0{,}3$ pg/ml plasmă (70). La aceiaşi pacienţi, după privare de lichide, osmolaritatea creşte dar nivelul AVP deşi creşte rămîne sub normal (70). Totdeauna AVP a fost detectabilă la această categorie de bolnavi.

La pacienţii cu *polidipsie psihogenă* sau cu *diabet insipid nefrogen*, osmolaritatea plasmei şi concentraţia AVP în plasmă sînt similare cu valorile obţinute la normali.

În apariţia *sindromului de secreţie inadecvată de hormon antidiuretic* (*SIADH*) sînt incriminate o varietate de cauze (tabelul II.3.2) (41, 25). Concentraţia AVP în plasmă variază în limite largi, de la 3 la 22 pg/ml (70), iar la cei cu tumori secretante de AVP ajunge la valori mult mai mari: 13—283 pg/ml (92).

3.3. VASOTOCINA

3.3.1. INTRODUCERE

Vasotocina a fost identificată întîi la vertebratele nemamifere (95) şi apoi în hipofiza (96, 97) şi în pineala mamiferelor (34, 35, 98, 99, 100). La om şi la bovine vasotocina este sintetizată sub forma arginin-8-vasotocină (AVT), pe cînd la porcine se sintetizează ca lizin-8-vasotocină (LVT) (34). Observaţia că vasotocina ar putea acţiona ca un hormon (factor) pineal antigonadotrop (101, 102), ca şi observaţiile privind prezenţa AVT în lichidele biologice la persoane normale (36) şi la pacienţi cu diabet insipid (103), demonstrarea biosintezei AVT în cultura de pineală fetală umană (104) sînt suficiente argumente care să justifice construirea unui sistem RIA pentru AVT.

Locul de sinteză al AVT pare să fie celula ependimară pineală (105, 106) iar locul şi mecanismul său de acţiune asupra hormonilor hipofizei anterioare constituie încă obiect de studiu (107, 108, 109, 110).

Detectarea în pineala umană a două structuri imunochimic înrudite, una cu neurofizina hipofizară umană şi alta cu neurofizina hipofizară bovină, pune problema dacă AVT este sintetizată, transportată şi eliberată ca şi AVP împreună cu o neurofizină (111).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.3.2.

Cauze ineriminate în instalarea sindromului de secreţie inadecvată de AVP
(referinţa 41)

Categoria	Entitatea clinică
Boli asociate cu producţia ectopică de AVP	Carcinomul bronşic cu celule în bob de ovăz Carcinom al pancreasului duodenului ureterului Carcinoide bronşice TBC pulmonar
Condiţii de stimulare volumetrică a eliberării de AVP	Pneumonia Sindromul postcomisurotomie Hemoragia Insuficienţa suprarenală Insuficienţa hipofizară Insuficienţa cardiacă congestivă
Condiţii de stimulare excesivă a SNC pentru eliberarea AVP	Traumatism cerebral Neoplasm cerebral Inflamaţii intracraniene: meningită, encefalită, abces cerebral Sindrom Guillain-Barré Porfiria acută intermitentă Hemoragia subarahnoidiană Medicamente: Clofibrat Vincristina Operaţii chirurgicale
Medicamente care cresc răspunsul AVP endogenă	Clorpropamida Carbamazepina
Terapie cu exces de hormoni retro-hipofizari	AVP şi analogi Ocitocină

3.3.2. METODE DE CANTIFICARE

Metodele biologice de cantificare a AVT se bazează pe efecte similare cu ale AVP. Testul pe vezică de broască se bazează pe efectul de permeabilizare al vezicii de broască (efectul hidroosmotic) (34, 69) prin care se poate detecta o activitate de aproximativ 50 μU de AVT (sub 25 pg). Acţiunea *hidroosmotică* a AVT este de peste 300 de ori mai mare decît a AVP; de exemplu activitatea hidroosmotică a AVP este de 70 U/mg faţă de 30 000 U/mg pentru AVT (38).

Testul *antidiurezei* la şobolan este construit pe efectul antidiuretic al AVT, similar dar de două ori mai redus decît al AVP (112): 430 U/mg pentru AVP faţă de 225 U/mg pentru AVT.

Activitatea *presoare* la şobolan (113) se află într-un raport similar cu activitatea antidiuretică şi anume: 400 U/mg pentru AVP şi 220 U/mg pentru AVT.

Deşi testul hidroosmotic este relativ simplu ca execuţie şi foarte sensibil, totuşi variabilitatea de răspuns a vezicilor de broască face ca acest procedeu să nu fie prea versatil.

Scanned with OKEN Scanner

De aceea a fost exploatată capacitatea unor seruri anti-LVP de a reacționa încrucișat complet nu numai cu AVP dar și cu AVT (91), în scopul de a construi un sistem RIA pentru AVT (114).

3.3.3. RADIOIMUNOANALIZA ARGININ-8-VASOTOCINEI

Din datele noastre rezultă că sisteme RIA pentru AVT au realizat două grupuri de cercetători (114, 167), sisteme însă impure, deoarece detectează aproape în mod egal AVT și AVP. Distincția între concentrația AVT și AVP se obține prin coroborarea cu rezultatele unui calcul al diferențelor de activitate biologică.

A. *Imunogenul.* LVP (91) sau AVP (167) conjugată cu tiroglobulină bovină (91) este inoculată la animal după înglobare în adjuvant.

B. *Antiserul* a fost preparat prin inoculări repetate ale conjugatelor la iepure. Diluția inițială folosită în sistemul RIA este de 1 : 20 000 sau de 1 : 25 000, în funcție de antiser.

C. *AVT marcată* a fost obținută prin radioiodurare cu ^{125}I după metoda cu cloramin-T. AVT folosit pentru marcare este un produs de sinteză cu activitate biologică de 140 UI/mg (Schwarz-Mann).

D. *Standardul: AVT* folosită pentru radioiodurare a servit și pentru construirea curbei standard cu gama de concentrație între 0,3 și 1 000 μU (2,1—700 pg) / eprubetă la un volum de incubare de 1 ml.

E. *Probele biologice.* Tehnica necesită extracția AVT din plasmă cu un agent adsorbant de exemplu bentonită (114).

F. *Incubarea reactivilor* se face timp de 4 zile cu preincubare în absența trasorului.

G. *Separarea* complexelor AVT legate de anticorp de ^{125}I-AVT se face prin tehnicile uzuale: dublu anticorp, PEG (polietilenglicol).

H. *Performanțele sistemului RIA*

Sensibilitatea sistemului se situează între 1,0 și 5 pg/ml.

Specificitatea: AVP interferează în sistemul RIA—AVT începînd de la concentrații de 25 pg.

3.3.4. APLICAȚII ȘI REZULTATE

Acestea sînt încă în studiu. Incapacitatea sistemelor RIA—AVT (construite cu antiseruri obținute prin metodele convenționale de imunizare) de a distinge AVT de AVP și de ocitocină a generat rezultate contradictorii privind prezența AVT în epifiza mamiferelor (115, 167, 168).

3.4. MELATONINA

3.4.1. INTRODUCERE

În competiție cu AVT pentru locul de „hormon major al pinealei" este o structură nepeptidică — melatonina (116, 117). Pineala este bogată în compuși indolici și anume: 5-metoxi-N-acetiltriptamina (melatonina), 5-metoxi- și 5-hidroxi-triptofol și 5-hidroxi-triptamina (serotonina). Prototipul acestei familii de compuși biologic activi este melatonina, capabilă să

Scanned with OKEN Scanner

reproducă multe efecte ale extractelor de pineală sau să corecteze efectele pinealectomiei. Melatonina a fost izolată din pineală dar şi din alte ţesuturi şi definită ca o substanţă cu proprietăţi antimelanofore; acţiunea sa de decolorare a pielii la amfibii este de 10 000 de ori mai puternică decît a noradrenalinei (118).

Majoritatea datelor de fiziologie a melatoninei provin din experienţele pe animale; există totuşi şi date referitoare la diferitele implicaţii în fiziopatologia umană (116, 117).

A. *Locul de sinteză şi rezerva*

Melatonina este sintetizată în pineală la mamifere, păsări, amfibii şi reptile (116, 119), a fost identificată şi în alte ţesuturi dar în concentraţii mult mai mici (118). Conţinutul în melatonină al pinealei bovine este de 40 ng şi de 1—5 ng în pineala de şobolan (118), ceea ce ar sugera că biosinteza este funcţie de masa ţesutului pineal.

S-a descris sinteza melatoninei în pinealomul ectopic (120) şi în metastaze ale unui pinealom parenchimatos (121).

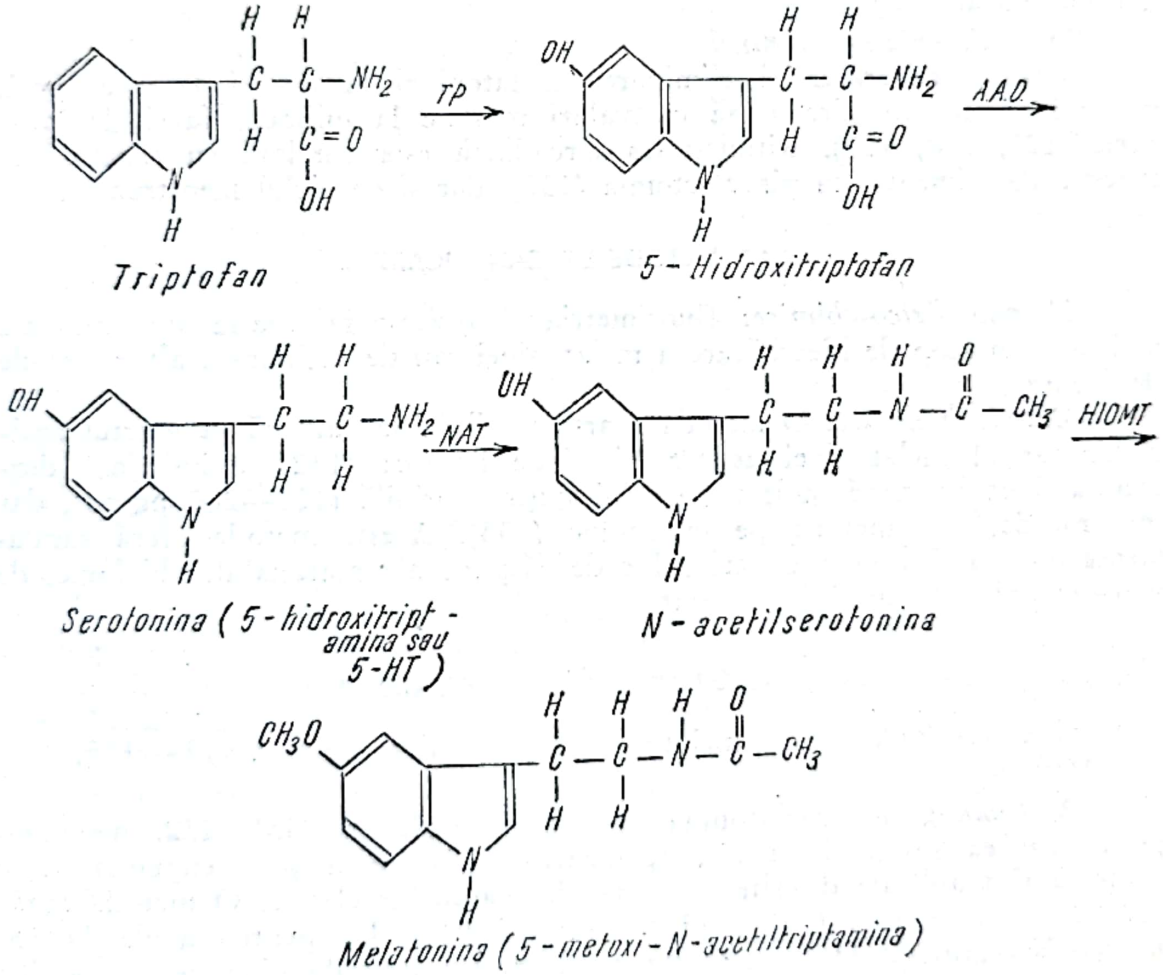


Fig. II.3.3. Biosinteza melatoninei.
TP = Triptofanhidroxilaza; A.A.D. = aromatic aminoacid-decarboxilaxa; NAT = N-acetiltransferaza; HIOMT=hidroxiliindol-o-metiltransferaza

B. *Natura chimică*

Melatonina este o structură indolică a cărei biosinteză are loc în două stadii: în primul stadiu se pleacă de la triptofan şi via serotonină se for-

Scanned with OKEN Scanner

mează serotonină acetilată, iar în al doilea stadiu are loc metilarea acetil-serotoninei (fig. II.3.3.) (122). În biosinteza melatoninei intervine hidroxiindol-O-metiltransferaza (HIOMT), o enzimă prezentă, se pare, numai în pineală (123, 124).

C. *Acțiunea melatoninei*

Se știe că, la mamifere, melatonina intervine la patru niveluri: în reglarea dezvoltării și funcției aparatului de reproducere (125), asupra funcției hipofizei, tiroidei și suprarenalei. Administrarea melatoninei nu influențează funcțiile timusului și ale pinealei (116, 117).

Pretratamentul cu clorpromazină întîrzie eliminarea melatoninei exogene și crește concentrația melatoninei endogene în pineală și în plasmă (126).

Aceste acțiuni ale melatoninei se exercită numai la administrarea unor doze mari, de exemplu de 100 μg pentru un șobolan, ceea ce sugerează mai degrabă o acțiune de tip farmacologic decît una fiziologică, ținînd seama că pineala șobolanului are un conținut cu 4—5 ordine de mărime mai mic. Acesta este unul din argumentele care pledează împotriva melatoninei ca hormon pineal (117).

D. *Fiziologia melatoninei*

Sinteza, eliberarea și eliminarea melatoninei la om și la alte specii prezintă ritmicitate circadiană cu valori minime la mijlocul fazei de întuneric (127, 128, 129). Ritmicitatea circadiană este corelată cu somnul, cu ingestia de alimente, cu pinealectomia (130), dar și cu ciclul menstrual (131).

3.4.2. METODE DE CANTIFICARE

Metode fizico-chimice: fluorimetria și gaz-cromatografia sînt utilizate mai mult în scop de identificare a melatoninei sau de validare a altor metode de dozare.

Metode biologice. O metodă foarte sensibilă se bazează pe efectul antimelanofor al melatoninei asupra pielii de broască (132), avînd însă dezavantajul că consumă mult timp. Mai puțin sensibilă (100—200 pg/ml), dar mai rapidă, este metoda pe mormoloc (133). Aceste metode oferă randamente mici și sînt expuse variațiilor de răspuns ale materialului biologic, de aceea metoda RIA ar fi de preferat.

3.4.3. RADIOIMUNOANALIZA MELATONINEI

Sistemele RIA pentru melatonină sînt de dată recentă (134, 135, 136, 137, 169).

A. *Imunogenul.* Melatonina este o moleculă cu GM = 232, neimunogenă prin ea însăși. Pentru antigenizarea melatoninei prin cuplarea cu o proteină sînt aplicate diferite variante ale metodelor clasice. O metodă (135) constă din acetilarea (136) D,L-5-metoxitriptofanului pentru a da D,L-5-metoxi-N-acetiltriptofan, care este apoi cuplat cu albumină serică bovină sau cu tiroglobulină bovină prin procedeul cu carbodiimidă (fig. II.3.4.). O altă metodă (137) constă din condensarea N-acetil-serotoninei prin reacția Mannich adăugînd albumină serică bovină și formaldehidă (139).

B. *Antiserul* se obține injectînd la iepuri doze de 1—2 mg de conjugat melatonină-proteină emulsionat în adjuvant Freund. După cîteva luni de insistențe se pot obține antiseruri cu un conținut convenabil de anticorpi.

Scanned with OKEN Scanner

C. *Trasorul.* Marcarea cu un izotop radioactiv (135): ^{3}H-melatonină (135) este preparată din 5-metoxitriptamină tritiată obținută prin acetilarea cu ^{3}H-anhidridă acetică (140). Activitatea specifică a ^{3}H-melatoninei este de aproximativ 6 Ci/mM (aprox. 20 μCi/μg). În sistemul RIA se adaugă circa 20 pg de trasor.

D. *Standardul* este melatonina sintetică comercială.

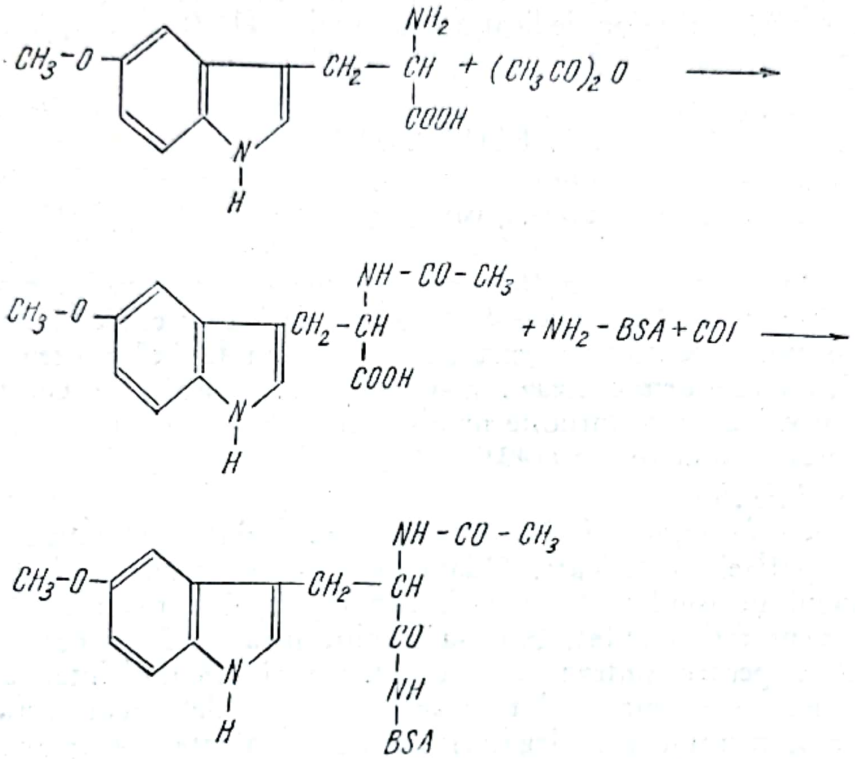


Fig. II.3.4. Sinteza conjugatului melatonină — albumină serică bovină (BSA) [CDI =3-(3-dimetil-amino-propil)] carbodiimidă (referința 136).

E. *Probele biologice:* serul, plasma, LCR, urina sau țesuturile sînt folosite după extracția prealabilă cu solvenți organici (129, 135, 137, 141, 142).

F. *Mediul și timpii de incubare* nu prezintă diferențe față de alte sisteme. Incubarea se face la temperatura de 37°C, timp de 30 minute apoi la +4°C, 16—20 de ore (137).

G. *Separarea* complexelor ^{3}H-melatonină — anticorp de melatonină liberă se face prin precipitare cu sulfat de amoniu (137).

3.4.4. APLICAȚII ȘI REZULTATE

Deținem puține date cu privire la aplicațiile sistemului RIA la om; acestea se referă la ritmicitatea circadiană (135, 137).

Un studiu comparativ între valorile obținute prin determinări biologice (133) și prin metoda RIA (135) arată că, la un grup de bărbați și femei între 24 și 43 de ani, concentrația plasmatică la ora 12 este de 126±41 pg/ml prin biodozare față de 132±10 pg/ml prin RIA și de 258±44 pg/ml față de 188±15 la ora 24. Diferența între miezul zilei și al nopții este semnificativă prin ambele metode dar variabilitatea este mai

Scanned with OKEN Scanner

redusă şi implicit şi gradul de semnificaţie este mai ridicat pentru rezultatele RIA. Cînd se studiază mai detaliat ritmul circadian la om, se observă că variabilitatea intraindividuală este totuşi accentuată în ceea ce priveşte intervalul de apariţie al maximului nocturn (între orele 22 şi 6) dar şi amplitudinea creşterii concentraţiei periferice a melatoninei (137). În cursul zilei concentraţia plasmatică a melatoninei nu trece de 20 pg/ml.

Implicaţiile melatoniei în fiziopatologie au fost amplu discutate cu ocazia unui recent simpozion dedicat acestui subiect (169).

3.5. NEUROFIZINELE

3.5.1. INTRODUCERE

Acher (15) demonstra în 1956 că o proteină cu rol transportor, pe care o numea neurofizină (16), poate fi separată de vasopresină şi de ocitocină cu care se combină pentru a forma „proteina Van Dyke" prezentă în hipofiza posterioară. Se demonstrează mai tîrziu că neurofizina constă din cel puţin două proteine strîns înrudite numite neurofizină I şi II, ambele capabile să lege vasopresina şi ocitocina (143).

A. *Locul de sinteză*

Neurofizinele hipofizei. Neurofizinele reprezintă al treilea produs de secreţie al hipofizei posterioare. Odată cu sinteza vasopresinei şi ocitocinei în perikarionul neuronilor din nucleii supraoptic şi paraventricular, se sintetizează şi neurofizina (144). Nu s-a stabilit încă dacă sinteza neurofizinei este obligatorie pentru sinteza celor doi hormoni. Odată sintetizată, neurofizina împreună cu hormonii sînt încărcaţi în granulele neurosecretorii unde asocierea lor se menţine prin legături slabe necovalente (145); granulele sînt transferate prin fluxul axonal de la perikarion la terminaţiile axonului de la hipofiza posterioară. S-a demonstrat că în multe situaţii, posibil în toate situaţiile, cele două octapeptide sînt eliberate din neurohipofiză în circulaţie odată cu neurofizinele (146). Observaţia că bolnavii cu hipofizectomie totală pot să nu prezinte diabet insipid a dus la concluzia că hipotalamusul însuşi poate secreta neurohipofizinele.

Neurofizinele pinealei. Se semnalează prezenţa unor neurofizine şi în pineala animalelor. Se pune în discuţie relaţia cu un alt octapeptid biologic activ arginin-vasotocina (AVT); conţinutul în neurofizine al pinealei este totuşi mic în comparaţie cu al AVT, ceea ce ar sugera că în pineală octapeptidul există sub formă liberă (147). În pineala umană au fost identificate prin RIA şi electroforeză două neurofizine: h-PN I şi h-PN II (148). Locul de sinteză ar putea fi celula ependimară pineală şi organul subcomisural, ceea ce atrage atenţia asupra posibilităţii ca formaţiuni circumventriculare ar putea alcătui un organ endocrin (149). Dacă este adevărat conceptul „o neurofizină — un hormon" (147) atunci problema este de ce se sintetizează două neurofizine pentru un singur octapeptid? Există şi un al doilea peptid biologic activ încă neidentificat? (148).

B. *Natura chimică şi relaţia cu octapeptidele*

Neurofizinele sînt proteine cerebrale, bogate în cistină, prezente în celulele neurosecretorii şi care leagă specific neurohormonii ocitocina, vasopresina şi unele peptide analoge (145). În cele ce urmează se vor face refe-

Scanned with OKEN Scanner

riri numai la neurofizinele retrohipofizare şi cu deosebire la cele umane, deşi majoritatea datelor de observaţie se bazează pe studiul neurofizinelor bovine.

Nu există date demonstrative pentru ipoteza că neurofizina este un „pro-hormon" al vasopresinei; pare mai probabil ca ea să fie un pro-hormon comun pentru ambele octapeptide — vasopresina şi ocitocina (144).

Studiul proprietăţilor chimice ale neurofizinei arată că în retrohipofiza de bou şi de porc există cel puţin trei neurofizine (150, 151), iar la om sînt descrise patru (152). Aceste neurofizine au greutăţi moleculare asemănătoare (de ordinul a 10 000) şi diferă între ele prin compoziţia în aminoacizi şi ca mobilitate electroforetică. Toate leagă stoichiometric octapeptidele şi se pare că posedă cîte un *situs* de legare per moleculă şi pentru ocitocină şi pentru vasopresină (38).

A fost elucidată secvenţa completă a aminoacizilor pentru neurofizina bovină II şi pentru neurofizina porcină I: fiecare este alcătuită din cîte 97 de aminoacizi cu 7 punţi disulfidice (153, 154). A fost stabilită şi secvenţa capului amino terminal al neurofizinei bovine I (155). Comparaţia secvenţelor cunoscute arată că există un mare grad de omologie, în special în jumătatea N-terminală a moleculei (38). Asemănările secvenţelor scurte din unele zone ale moleculei de neurofizină cu secvenţa vasopresinei şi a ocitocinei a sugerat ipoteza că genele structurale care conţin codul hormonilor neurohipofizari ar putea fi încorporate în genele care ar genera transportorii lor — neurofizinele (155).

In vitro, toate neurofizinele pot lega şi vasopresina şi ocitocina, dar în retrohipofiză s-ar putea să existe un proces de selecţie (38). Există experienţe (156) care au dus la sortarea populaţiei de granule neurosecretorii în granule bogate în vasopresină şi bogate în ocitocină. Ocitocina a fost localizată în granule care conţin dominant neurofizină I, iar vasopresina în cele care conţin mai ales neurofizină II. Se presupune că asocierea octapeptidelor cu diferiţi transportori ar putea servi ca un mecanism de eliberare independentă a vasopresinei şi ocitocinei din hipofiza posterioară (38).

C. *Rolul biologic al neurofizinelor*

La om, s-a observat un singur efect semnificativ după injecţia de neurofizină umană II şi anume scăderea concentraţiei aminoacizilor în ser. Se postulează trei mecanisme, care ar putea explica acest efect şi anume: creşterea aminoaciduriei prin scăderea reabsorbţiei tubulare; o reacţie catabolică cu transaminare sau dezaminare şi creşterea ureei în urină şi o reacţie anabolică cu sinteză de polipeptide şi retenţie de azot (156).

Efectul de creştere a natriurezei (157) ar putea fi datorit contaminării cu vasopresină.

D. *Reglare şi control*

Factorii care influenţează sinteza, stocarea şi eliberarea neurofizinelor, independent de a hormonilor transportaţi, nu sînt cunoscuţi. Probele dinamice de inhibiţie şi de stimulare a eliberării neurofizinelor sînt inspirate din studiile asupra octapeptidelor transportate. Totuşi, nu totdeauna creşterea sau scăderea nivelului circulant al neurofizinelor este predictibilă pe baza rezultatelor obţinute dozînd octapeptidele.

E. *Terminologie*

Numărul neurofizinelor sintetizat de diferite specii nu este încă precizat. La om, se admite existenţa a patru neurofizine: două majore şi două minore (158). Deşi neurofizinele umane folosite de cercetători diferiţi diferă

Scanned with OKEN Scanner

după tehnica de izolare şi de purificare folosită, se poate încerca o unificare. Astfel, neurofizina umană I (HNpI) a lui Legros (158) corespunde în mare cu neurofizina stimulată de nicotină (NSN) a lui Robinson (159), iar neurofizina umană II (HNpII) (158) corespunde cu neurofizina stimulată de estrogeni (ESN) (159). Electroforetic, neurofizina umană NpI a lui Cheng (160) ar corespunde cu ESN. NpII bovină pare să corespundă cu ESN dar şi NpI şi NpII bovine răspund la teste dinamice adecvate pentru NSN (161).

3.5.2. RADIOIMUNOANALIZA NEUROFIZINELOR

A. *Sisteme RIA heterologe, mixte şi omologe.* Neurofizinele umane I şi II sînt cantificate cu ajutorul sistemelor RIA *heterologe*, folosind sisteme RIA pentru NpI şi NpII bovine (161). Valorile obţinute sînt mai mari decît cele în sistem omolog.

Primul sistem RIA *omolog* măsoară neurofizinele totale, întrucît se observă că apar variaţii şi în situaţii în care dominant variază vasopresina şi în cele în care variază ocitocina (158, 162). Sistemele RIA omologe (152, 159, 160) sînt diferenţiate pentru cele două neurohipofizine dominante (I-NSH şi II-ESN). Sistemele RIA umane pot fi folosite şi pentru studii la maimuţe (163).

Substituind în sistem RIA heterolog standardul bovin cu un standard N I respectiv N II se pot obţine valori mai apropiate de sistemele omologe.

La porc, NI şi NII se măsoară cu sisteme RIA omologe. Cu o mixtură de RIA-NI şi RIA-NII, adică standard porcin N I şi ser anti N II porcină, se poate doza neurofizina la şobolan (164).

În paragrafele următoare vor fi prezentate sisteme RIA omologe pentru N I—NSN şi N II—ESN (152, 159).

Rezultatele obţinute de diferiţi autori în condiţii bazale (158, 159, 160, 161) diferă numeric între ele dar rămîn de acelaşi ordin (ng/ml). Diferenţele sînt urmarea neuniformizării standardelor.

B. *Imunogenul.* Neurofizine umane parţial purificate corespunzînd benzilor 1 şi 2 la disc-electroforeza preparativă pe gel de acrilamidă sînt folosite ca imunogen pentru a obţine antiser adecvat pentru RIA-N I (NSN) iar materialul care conţine dominant banda 3 se foloseşte pentru a obţine antiser pentru RIA-N II (ESN). Substanţa selecţionată este înglobată în adjuvant Freund (159).

C. *Antiserul.* Iepurii sînt injectaţi cu doze de aproximativ 1 mg intradermic în multiple locuri, s.c., i.m., după schemele uzuale (160). Toate animalele produc antiseruri dar majoritatea reacţionează nediferenţiat cu ambele neurofizine. De aceea se selecţionează acele antiseruri care reacţionează dominant cu una din cele două neurofizine. Dacă antiserul este suficient de specific şi are titrul ridicat, poate fi folosit fără adsorbţie prealabilă (159). De exemplu, pentru ESN s-a obţinut titrul final de 1 : 300 000 (159).

D. *Iodurarea neurofizinelor.* Se foloseşte metoda cu cloramina T. Neurofizina în cantitate de 10 μg, dizolvată în NaCl 0,9 g% este iodurată în tampon-fosfat 0,5 M, pH=7,5. Amestecul de marcare este purificat pe coloană de Sephadex G-25 (0,9/18 cm) în tampon Tris-HCl 0,05 M, pH=7,5 şi repurificat pe Sephadex G-75 (0,9/55 cm) în acelaşi tampon (161). Neurofizinele marcate sînt relativ stabile, putînd fi folosite 2—4 luni, eventual repurificate. Se pare că uneori apar fenomene de agregare în timpul conservării.

Scanned with OKEN Scanner

E. *Preparatele standard.* Banda 2 de la disc-electroforeză preparativă este folosită ca standard pentru RIA-NI-NSN şi neurofizina Cheng şi Friesen (160), pentru RIA—NII—ESN. Menţionăm că nu a fost elaborat încă un standard internaţional, ceea ce face ca rezultatele să difere între ele.

F. *Condiţii de incubare.* Sînt folosite medii tamponate ca tampon veronal-HCl 0,02 M, pH=7,5 sau Tris-HCl 0,05 M, pH=5, albuminate, cu incubare preferabil la rece. Condiţiile de incubare pot să nu fie identice (mediu, durată, temperatură) pentru cele două neurofizine. Condiţiile trebuie optimizate în funcţie de calitatea antiserului. Preincubarea, care poate fi prelungită 2—3 zile, poate creşte substanţial sensibilitatea sistemului.

G. *Tehnica de separare* care dă legarea nespecifică cea mai mică este cea cu dublu anticorp (158).

H. *Performanţele sistemului*

Sensibilitatea. Cea mai mică doză detectabilă este 0,5—0,6 ng/ml în ambele sisteme RIA.

Specificitatea. ESN interferează slab în RIA-NSN şi invers.

Precizia este similară cu a altor sisteme RIA.

I. *Probele biologice.* Ambele sisteme RIA permit măsurarea NSN şi a ESN în lichide biologice neprelucrate.

Sîngele este recoltat de la pacienţi la orice oră, întrucît nu există ritmicitate circadiană (161). Dozarea se face în plasma din sîngele heparinat recoltat din vena cubitală, din cordonul ombilical sau prin puncţie în deget la nou-născuţi.

Alte lichide biologice: lichid amniotic şi LCR.

J. *Condiţii bazale:* dozarea se poate face pe o singură probă deoarece neurofizinele nu prezintă descărcări pulsatile.

K. *Probe dinamice.* Sînt descrise numeroase probe dinamice (159).

Proba de stimulare prin fumat: sîngele este recoltat cu 30 de minute înainte, în momentul zero şi la 30, 60, 90 şi 120 de minute după ce subiectul a fumat două ţigări în interval de 30 de minute. Loturile de subiecţi trebuie să fie uniforme: nefumători sau fumători moderaţi.

Proba de stimulare cu estrogeni. Se administrează cîte 50 mg dietilstilbestrol / zi, timp de cinci zile. Sîngele este recoltat de două ori pe zi cîteva zile înainte de probă, în timpul şi 1—2 zile după administrare.

3.5.3. APLICAŢII CLINICE ŞI REZULTATE

La om au fost puse în evidenţă două neurofizine: neurofizina stimulată de nicotină (NSN) şi neurofizina stimulată de estrogeni (ESN) (165). La normali, valorile bazale ale NSN şi ESN sînt similare: $1{,}0 \pm 0{,}7$ ng/ml şi respectiv $0{,}9 \pm 0{,}3$ ng/ml.

A. *Neurofizina stimulată de nicotină.* Dozarea simultană a neurofizinei şi a vasopresinei la persoane supuse probei de stimulare prin fumat arată că la peste 50% cresc valorile plasmatice, şi ale vasopresinei şi ale neurofizinei (166), cu un grad mare de corelaţie între valorile hormonului şi ale proteinei transportoare.

În cursul *stress*-ului chirurgical se observă de asemenea creşterea în strînsă corelaţie a vasopresinei şi a NSN, creştere ce pare să fie proporţională cu amploarea intervenţiei (165). Nivelul neurofizinei stimulată de estrogeni nu se modifică în *stress*-ul chirurgical.

Scanned with OKEN Scanner

În diabetul insipid hipotalamic, concentrația plasmatică a NSN este sub 1 ng/ml în condiții bazale și nu se modifică prin fumat.

Sindromul de secreție inadecvată de vasopresină poate fi datorit, fie unei secreții ectopice tumorale de vasopresină, fie unei secreții excesive de neurofizină. S-a demonstrat că unele tumori pot secreta vasopresină fără să sintetizeze și neurofizină (165).

B. *Neurofizina stimulată de estrogeni.* Denumirea pornește și de la observația că neurofizina crește în sarcină (162). Acum se știe că această creștere este datorită estrogenilor și s-a observat că crește și la femei care iau anticoncepționale și la bărbați normali cărora li se administrează estrogeni (160).

Neurofizina care crește în sarcină și care este stimulată prin administrarea estrogenilor, este o neurofizină specific umană, ESN, distinctă de NSN (152). S-ar putea ca ESN să fie asociată cu ocitocina, dar problema nu este suficient de clară (165).

ESN în stări patologice ale neurohipofizei. În sindromul de secreție inadecvată de vasopresină crește NSN dar poate crește și ESN, fără să fie vorba de reacții încrucișate în sistemele de dozare RIA. În diabetul insipid, NSN lipsește dar ESN poate să persiste. Administrarea estrogenilor la pacienți cu diabet insipid determină creșterea ESN. Aceasta ar sugera că în diabetul insipid secreția ocitocinei rămîne intactă, ca dovadă că nașterea la femei cu diabet insipid se desfășoară normal.

Dozarea simultană a ESN și a ocitocinei ar putea clarifica posibila lor asociere analog cu asocierea NSN — vasopresină.

BIBLIOGRAFIE

1. **Rathke M. H.** — Archiv. für Anatomie Physiologie Wiss. Med., 1838, *4*, 482.
2. **Oliver G., Schafer E. A.** — J. Physiol., 1895, *18*, 277.
3. **Howell W. E.** — J. Exp. Med., 1898, *3*, 245.
4. **Magnus R., Schafer E. A.** — J. Physiol., 1901, *27*, 9.
5. **Frank J. E.** — Klin. Wschr., 1912, *49*, 393.
6. **Farmi F.** — Wien. Klin. Wschr., 1913, *26*, 1 867.
7. **Velden (van den) R.** — Klin. Wschr., 1913, *50*, 2 083.
8. **Dale H. H.** — J. Physiol., 1906, *34*, 1 609.
9. **Blair-Bell W.** — Brit. Med. J., 1909, *2*, 1 609.
10. **Ott I., Scott J. C.** — Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y., 1910, *8*, 48.
11. **Dudley H. W.** — J. Pharmacol., 1919, *14*, 295.
12. **Kamm O., Aldrich T. B., Grote I. W., Rowe L. M., Bugbee F. P.** — J. Amer. Chem. Soc., 1928, *50*, 533.
13. **Rosenfeld M.** — Bull. Johns Hopkins Hosp., 1940, *66*, 398.
14. **Dyke (van) H. B., Chow B. F., Greep R. O., Rothen A. J.** — J. Pharmacol., 1942, *74*, 190.
15. **Acher R., Chauvet J., Olivery G.** — Biochim. Biophys. Acta., 1956, *22*, 421.
16. **Acher R., Chauvet J., Lenci M. T.** — Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, *40*, 2 005.
17. **Potts A. M., Gallagher T. F.** — J. Biol. Chem., 1942, *143*, 561.
18. **Potts A. M., Gallagher T. F.** — J. Biol. Chem., 1944, *154*, 349.
19. **Livermore A. H., Vigneaud (du) V.** — J. Biol. Chem., 1949, *180*, 365.
20. **Pierce J. G., Vigneaud (du) V.** — J. Biol. Chem., 1950, *182*, 359.
21. **Vigneaud (du) V., Ressler C., Trippett S.** — J. Biol. Chem., 1953, *205*, 949.
22. **Vigneaud (du) V., Gish D. T., Katsoyannis P. G., Hess G. P.** — J. Amer. Chem. Soc., 1958, *80*, 3 355.

Scanned with OKEN Scanner

23. **Turner R. A., Pierce J. G., Vigneaud (du) V.** — J. Biol. Chem., 1951, *191*, 21.
24. **Popenoe E. A., Lawler H. C., Vigneaud (du) V.** — J. Amer. Chem. Soc., 1952, *74*, 3 713.
25. **Vigneaud (du) V., Bartlett M. F., Johl A.** — J. Amer. Chem. Soc., 1957, *79*, 5 572.
26. **Scharrer E., Scharrer B.** — Res. Publ. Ass. Nerv. Ment. Dis., 1949, *20*, 170.
27. **Bargmann W.** — Ztsc. f. Zellforsch. u. Mikrosk. Anat., 1949, *34*, 610.
28. **Barer R., Heller H., Lederis K.** — Proc. Roy. Soc. B., 1963, *158*, 388.
29. **Jones C. W., Pickering B. T.** — J. Physiol., 1970, *208*, 73 p.
30. **Zimmerman E. A., Carmel P. W., Husain M. K., Ferin M., Tannenbaum M., Frantz A. G., Robinson A. G.** — Science, 1973, *182*, 925.
31. **Rodriguez E. M.** — J. Endocrinol., 1976, *71*, 407.
32. **Katsoyannis P. G., Vigneaud (du) V.** — J. Biol. Chem., 1958, *233*, 1 352.
33. **Sawyer W. H.** — În: „Neurophypophyseal Hormones and Similar Polypeptides" (editat de B. Berde), Springer, New York, 1968, p. 734.
34. **Pavel S.** — Endocrinol., 1965, *77*, 812.
35. **Pavel S., Petrescu S.** — Nature (Lond.), 1966, *212*, 1 054.
36. **Pavel S.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1970, *31*, 369.
37. **Glick S. M.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson şi R. S. Yalow), North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, vol. 2 A, 692.
38. **Frieden E. H.** — Chemical Endocrinology, Academic Press, New York, 1976, p. 173.
39. **Tindal J. S.** — În: „Handbook of Physiology" (editat de E. Knobil şi W. H. Sawyer), Williams and Wilkins co, Baltimore, 1974, vol. 4, p. 257.
40. **Gaitan E., Cobo E., Mizrachi M.** — J. Clin. Invest., 1964, *43*, 2 310.
41. **Edwards C. R. W.** — În: „Clinics in Endocrinology and Metabolism" (editor invitat: G. M. Besser), W. B. Saunders, Co Ltd., Londra, 1977, p. 223.
42. **Fitzpatrick R. J.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology (editat de S. A. Berson şi R. S. Yalow), North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, vol. 2 A, p. 691.
43. **Dongen (van) C. G., Hays R. L.** — J. Anim. Sci., 1964, *23*, 1 229.
44. **Dongen (van) C. G., Hays R. L.** — Endocrinology, 1966, *78*, 1.
45. **Gilliland P. F., Prout T. E.** — Metabolism, 1965, *14*, 918.
46. **Glick S. M., Kumaresan P., Kagan A., Wheeler M.** — În: „Protein and Polypeptide Hormones" (editat de M. Margoulies), Excerpta Medica, New York, 1969, p. 81.
47. **Chard T., Kitau M. J., Landon J.** — J. Endocrinol., 1970, *46*, 269.
48. **Chard T., Forsling M. L., James M. A. R., Kitau M. J., Landon J.** — J. Endocrinol., 1970, *46*, 533.
49. **Chard T., Boyd N. R. H., Forsling M. L., Mc. Neill A. S., Landon J.** — J. Endocrinol., 1970, *48*, 223.
50. **Glick S. M.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson şi R. S. Yalow), North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, vol. 2 A, p. 704.
51. **Kagan A., Glick S. M.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe şi H. R. Behrman), Academic Press, New York, 1974, p. 173.
52. **Chard T.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 1977, p. 209.
53. **Berson S. A., Yalow R. S., Bauman A., Rotschild M. A., Newerly R.** — J. Clin. Invest., 1956, *35*, 170.
54. **Bashore R. A., Jafek B., Coblence C.** — Obstet. Gynecol., 1970, *36*, 391.
55. **Boyd N. R. H., Jackson D. B., Hollingsworth S., Forsling M. L., Chard T.** — J. Endocrinol., 1972, *52*, 59.
56. **Gibbens D., Boyd N. R. H., Chard T.** — J. Endocrinol., 1972, *53*, 1.
57. **Chard T., Hudson C. N., Edwards C. R. W., Boyd N. R. H.** — Nature (Lond.), 1971, *234*, 352.
58. **Dawood M. Y., Fuchs F., Pociask C., Raghavan K. S.** — Abstr-Short Commun. 5th Internat. Congress of Endocrinology, Hamburg, 1976, p. 112.
59. **Marks L. J., Berde B., Klein L. A., Rith J., Goonan S. R., Blumen D., Nabseth D. C.** — Amer. J. Med., 1965, *45*, 967.

Scanned with OKEN Scanner

60. **Chard T.** — În: „Current Topics in Experimental Endocrinology" (editat de L. Martini și V. H. T. James), Academic Press, New York — Londra, 1971, vol. 1, p. 81.
61. **van Wimersma Greidanus T. B., Dogterom J., Wied de D.** — Life Sciences, 1975, *16*, 637.
62. **Share L.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow) North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, vol. 2 A, p. 652 și 668.
63. **Bijesma U. G., Burn J. H., Gaddum J. H.** — Wuart. J. Pharm., 1928, *1*, 493.
64. **Jeffers W. A. M., Livezey M., Austin J. H.** — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1942, *50*, 184.
65. **Forsling M. L., Jones I. I., Lee J.** — J. Physiol., 1968, *196*, 495.
66. **Dekanski J.** — Brit. J. Pharm., 1951, *6*, 351.
67. **Dekanski J.** — Brit. J. Pharm., 1952, *7*, 567.
68. **Sawyer W. H., Valtin H.** — Endocrinol., 1967, *80*, 207.
69. **Sawyer W. H.** — Endocrinology, 1960, *66*, 112.
70. **Robertson G. L., Roth J., Beardwell C., Klein L. A., Petersen M. J., Gorden P.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow) North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, vol. 2 A, p. 656.
71. **Roth J., Glick S. M., Klein L. A., Petersen M. J.** — J. Clin. Endocr. Metab., 1966, *26*, 671.
72. **Wu W. H., Rockey J. H.** — Biochemistry, 1969, *8*, 2 719.
73. **Beiser S. M., Butler V. P. jr., Erlanger B. F.** — În: „Textbook of Immunopathology" (editat de P. A. Milscher și H. J. Müller-Eberhard), Grune and Stratton, New York, ed. II, 1976, vol. 1, p. 15.
74. **Permutt M. A., Parker C. W., Utiger T. D.** — Endocrinol., 1966, *78*, 809.
75. **Miller M., Moses A. M.** — Endocrinol., 1969, *84*, 557.
76. **Oyama S. N., Kagan A., Glick S. M.** — J. Clin. Endocr. Metab., 1971, *33*, 739.
77. **Menard J., Milliez P.** — C. R. Acad. Sc. Paris, 1970, *270*, 1 053.
78. **Beardwell C. G.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1971, *33*, 254.
79. **Edwards C. R. W., Chard T., Kitau M. J., Forsling M. L., Landon J.** — J. Endocr., 1972, *52*, 279.
80. **Glick S. M., Kagan A.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press, New York, 1974, p. 187.
81. **Czernichow P., Merkelbach U., Vallotton M. B.** — Acta Endocr., 1975, *80*, 444.
82. **Freisenheusen H. D., Frahm H., Cabrijan T., Wiethold G.** — Acta Endocr., 1976, *83*, 50.
83. **Wagner H., Maier V., Häberle M., Franz H. E.** — În: „IAEA Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31.X.—4.XI. 1977.
84. **Rougon-Rappuzi G., Conte-Devolx B., Millet V., Delaage M. A.** — În: IAEA Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31.X. — 4.XI. 1977.
85. **Husain K. M., Fernando N., Shapiro M., Kagan A., Glick S. M.** — J. Clin. Endocr. Metab., 1973, *37*, 616.
86. **Stürmer E.** — În: „Handbuch der experimentellen Pharmakologie" (editat de B. Berde), Springer Verlag, Berlin, 1968, vol. 23, p. 130.
87. **Robertson G. L., Mahr E. A., Athar S., Inha T. S.** — J. Clin. Invest., 1973, *52*, 2 340.
88. **Hobbs J. R.** — În: „Supra Regional Assay Service", Anglia, 1976, p. 40.
89. **Van Der Horn M. J., Schellekens A. P. M., Tauber J. L.** — Neth. J. Med., 1975, *18*, 205.
90. **Rubin R. T., Poland R. E., Ravessaud F.** — Endocr. Res. Commun., 1975, *2*, 459.
91. **Skowsky W. K., Rosenblum A. A., Fischer D. A.** — J. Clin. Endocr. Metab., 1974, *38*, 278.
92. **Morton J. J., Padfiled P. L., Forsling M. L.** — J. Endocrinol., 1975, *65*, 411.
93. **Beardwell C. G., Geelen G., Palmer H. M., Roberts D., Salamonson L.** — J. Endocr., 1975, *67*, 189.
94. **Bartter F. C.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow) North-Holand Publ., Co., Amsterdam, 1973, vol. 2 A, p. 672.

Scanned with OKEN Scanner

95. **Sawyer W. H.** — În: „Handbuch der experimentellen Pharmakologie" (editat de B. Berde), Springer Verlag, Berlin, 1968, vol. 23, p. 717.
96. **Vizsolyi E., Perks A. M.** — Nature (Lond.), 1969, *223*, 1 169.
97. **Skowsky W. R., Fischer D. A.** — Clin. Res., 1973, *21*, 205.
98. **Cheesman D. W.** — Biochim. Biophys. Acta., 1970, *207*, 247.
99. ******* — Endocrinol., 1963, *72*, 563.
100. **Pavel S.** — Endocrinol., 1971, *89*, 613.
101. **Pavel S., Petrescu M., Vicoleanu N.** — Neuroendocrinology, 1973, *11*, 370.
102. **Pavel S., Dumitru I., Klepsch I., Dorcescu M.** — Neuroendocrinology, 1973/74, *13*, 41.
103. **Coculescu M., Pavel S.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1973, *36*, 1 031.
104. **Pavel S., Dorcescu M., Petrescu-Holban R., Ghinea E.** — Science, 1973, *181*, 1 252.
105. **Pavel S., Goldstein R., Calb M.** — J. Endocr., 1975, *66*, 283.
106. **Pavel S., Goldstein R., Ghinea E., Calb M.** — Endocrinol., 1977, *100*, 205.
107. **Pavel S., Coculescu M.** — Endocrinol., 1972, *91*, 825.
108. **Pavel S., Mătrescu L., Petrescu M.** — Neuroendocrinology, 1973, *12*, 371.
109. **Pavel S.** — Nature New Biol., 1973, *246*, 183.
110. **Pavel S., Gheorghiu C., Calb M., Petrescu M.** — Endocrinol., 1975, *97*, 674.
111. **Reinharz A. C., Vallotton M. B.** — Endocrinol., 1977, *100*, 994.
112. **Munsick R. A., Sawyer W. H., van Dyke H. B.** — Endocrinology, 1960, *66*, 860.
113. **Usp XV** — The Pharmacopeia of the USA 15ht Revision-Pharmacopeial Convention, Washington, 1955.
114. **Rosenbloom A. A., Fisher D. A.** — Endocrinology, 1974, *95*, 1 726.
115. **Skowsky W. R., Fisher D. A.** — Pediat. Res., 1977, *11*, 627.
116. **Damian E.** — Rev. Roum. Endocrinol., 1974, *11*, 81.
117. **Damian E.** — Rev. Roum. Med. Endocrinol., 1978, *16*, 3.
118. **Lerner A. B., Wataru M., Case J. D., Wright M.** — Nature (Lond.), 1959, *183*, 1 821.
119. **Wurzman R. J., Axelrod J., Kelly D. F.** — „The Pineal", Academic Press, New York—Londra, 1968.
120. **Wurtman R. J., Kamma H.** — New Engl. J. Med., 1966, *274*, 1 233.
121. **Wurtman R. J., Axelrod J., Roch R.** — Nature (Lond.), 1964, *204*, 1 323.
122. **Axelrod J., Weissbach H.** — Science, 1960, *131*, 1 312.
123. **Axelrod J., Weissbach H.** — J. Biochim., 1961, *236*, 211.
124. **Axelrod J., Wurtman R. J., Snyder S. H.** — J. Biol. Chem., 1965, *240*, 949.
125. **Axelrod J.** — În: „The Pineal gland" (editat de G. E. W. Wolstenholme and. J. Knight), Churchill Livingstone, Edinburgh-Londra, 1971.
126. **Ozaki J., Linch H. J., Wurtman R. J.** — Endocrinol., 1976, *98*, 1 418.
127. **Pelham R. W., Vaughan G. M., Sandock K. L., Vaughan M. K.** — J. Clin. Endocrinol., 1973, *37*, 341.
128. **Vaughan G. M., Pelham R. W., Pang S. F., Loughlin L., Wilson K., Sandock K., Vaughan M. K., Koslov S., Reiter R. J.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1976, *42*, 752.
129. **Linch H. J., Wurtman R. J., Moskowitz M. A., Archer M. C., Ho M. H.** — Science, 1975, *187*, 171.
130. **Linch H. J., Ohaki Y., Shakal D.** — In. J. Biometeorol., 1975, *19*, 267.
131. **Wetterberg L., Arendt J., Paunier L., Sizonenko P. C., Van Donselaar M., Heyden T.** — J. Clin. Endocr. Metab., 1976, *42*, 185.
132. **Mori W., Lerner A. B.** — Endocrinol., 1960, *67*, 443.
133. **Ralph C. L., Lynch G. J.** — Gen. Comp. Endocrinol., 1970, *15*, 334.
134. **Levine L., Riceberg L.** — Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 1975, 693, *10*.
135. **Arendt J., Paunier L., Sizonenko P. C.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1975, *40*, 347.
136. **Rollay M. D., Niswender G. D.** — Endocrinol., 1976, *98*, 482.
137. **Kennaway D. J., Frith R. C., Phillipow C., Matthews C. D., Seamartk F.** — Endocrinol., 1977, *101*, 119.

Scanned with OKEN Scanner

138. Berg C. P., Rose W. C., Hawel C. S. — J. Biol. Chem., 1929—1930, *85*, 209.
139. Grota L. J., Brown G. — Can. J. Biochem., 1973, *53*, 196.
140. Kopin I. J., Pare C. M. B., Axelrod J., Weissbach H. — J. Biol. Chem., 1961, *236*, 3 072.
141. Smith I., Mullen P. E., Silman R. E. — Nature (Lond.), 1976, *260*, 718.
142. Smith J. A., Mee T., Barnes N. D. — Lancet, 1976, *2*, 425.
143. Hollenberg M. D., Hope D. B. — Biochem. J., 1968, *106*, 557.
144. Sachs H., Fawcet P., Takabatake Y. — Recent Progr. Horm. Res., 1969, *25*, 447.
145. Hope D. B. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, *248*, 6.
146. Robinson A. G., Frantz A. G. — Metabolism, 1973, *22*, 1 047.
147. Legros J. J., Louis G., Grotschel Stewart U., Franchimont P. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, *248*, 157.
148. Reinharz A. C., Valloton M. B. — Endocrinology, 1977, *100*, 994.
149. White W. F., Hedlung M. T., Waber C. F., Rippel R. H., Johnson E. S., Wilber J. F. — Endocrinology, 1974, *94*, 1 422.
150. Rauch R., Hollenberg M. D., Hope D. B. — Biochem. J., 1969, *115*, 473.
151. Cheng K. W., Friesen H. G. — J. Biol. Chem., 1972, *246*, 7 656.
152. Robinson A. G. — J. Clin. Invest., 1975, *55*, 360.
153. Wuu T. C., Crumm S., Saffran M. — J. Biol. Chem., 1971, *246*, 6 043.
154. Schlesinger D. H., Frangione B., Walter R. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1972, *69*, 3 350.
155. Capra J. D., Kehoe J. M., Kotelchuck D., Walter R., Breslow E. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1972, *69*, 431.
156. Trygstad O., Foss I., Sletten K. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, *248*, 304.
157. Robinson A. G., Michelis M. F., Warms P. C., Davis B. B. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, *248*, 317.
158. Legros J. J. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, *248*, 281.
159. Robinson A. G. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, *248*, 246.
160. Chemg K. W., Friesen H. G. — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1973, *36*, 553.
161. Tissot-Berthet M. C., Reinharz A. C., Vallotton M. B. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, *248*, 257.
162. Legros J. J., Franchimont P., Hendrick J. C. — C. R. Soc. Biol. (Paris), 1969, *163*, 2 773.
163. Robinson A. G., Ferin M., Zimmerman E. A. — Endocrinol., 1976, *98*, 468.
164. Cheng K. W., Friesen H. G. — Metabolism., 1970, *19*, 876.
165. Robinson A. G. — În: „Clinics in Endocrinology and Metabolism" (editor invitat: G. M. Besser), W. B. Saunders Co Ltd., Londra — Philadelphia — Toronto, 1977, p. 261.
166. Husain M. K., Frantz A. G., Ciarochi F. F., Robinson A. G. — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1975, *41*, 1 113.
167. Fernstrom J. D., Fisher L. A., Cusack B. M., Gillis M.A. — Endocrinology, 1980, 106, 243.
168. Fisher L. A., Fernstrom J. D. — Life Sciences, 1981, 28, 1471.
169. *_* Melatonin: Current Status and Perspectives (Proc. Internat. Symp. Melatonin, Bremen, RFG, Sept. 28-30, 1980), (N. Birau a. W. Schloot editors), Pergamon Press, Oxford, 1981.

Scanned with OKEN Scanner

4

IODOTIRONINE, IODOTIROZINE ŞI TIROGLOBULINE

CONSIDERAŢII GENERALE

Diagnosticul şi terapia bolilor tiroidei se bazează pe cunoaşterea proceselor de biosinteză a hormonilor tiroidieni.

Biosinteza hormonilor tiroidieni. Iodul este elementul esenţial pentru biosinteza intratiroidiană a celor doi hormoni metabolic activi: L-tetraiodotironina sau T_4 (denumită curent tiroxină) şi L-triiodotironina sau T_3. Cu ajutorul izotopilor radioactivi, în ultimii 35 de ani au fost clarificate principalele etape ale biosintezei hormonilor tiroidieni; evoluţia acestor cercetări poate fi urmărită în lucrări de sinteză publicate relativ recent (1, 2, 3, 4).

Celulele tiroidiene captează iodura din sînge şi o oxidează la iod elementar (procesul de iodinare). Capacitatea ionilor perclorat şi tiocianat de a bloca procesul de iodinare stă la baza terapiei tirostatice. Treapta următoare constă din procesul de iodare prin care iodul elementar este încorporat în poziţiile 3 sau 3 şi 5 ale tirozinei prezentă în proteina prohormon — tiroglobulina — pentru a forma 3-monoiodotirozina (MIT) şi 3,5 — diiodotirozina (DIT), precursori ai T_4 şi T_3. Formarea MIT şi DIT poate fi limitată prin inhibiţia procesului de iodare cu ajutorul antitiroidienelor de sinteză de tip tiouracil sau metilmercaptoimidazol.

În faza următoare — hormonală — are loc cuplarea unei molecule de MIT cu o moleculă de DIT pentru a forma 3,5,3′ — triiodotironina (T_3) şi cuplarea a două molecule de DIT pentru a forma 3,5,3′,5′ — tetraiodotironina (T_4) (fig. II.4.1. şi II.4.2.).

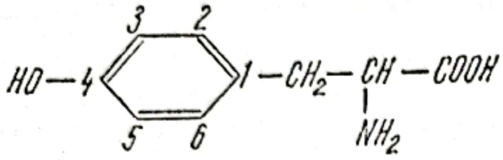
În glanda tiroidă T_3 şi T_4 rămîn legate la tiroglobulină. În tiroida normală, iodul este distribuit astfel: 17—28% ca MIT, 25—42% ca DIT, 35% ca T_4 şi numai 5—8% ca T_3.

Recent s-a arătat (5) că tiroglobulina preparată din tiroide normale mai conţine un compus: 3,3′,5′ — triiodotironina sau rT_3 sau T_3 prim (T_3 răsturnată, în engleză T_3 reverse). Conţinutul diferiţilor hormoni tiroidieni

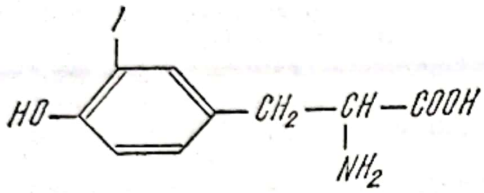
Scanned with OKEN Scanner

per miligram de hidrolizat de tiroglobulină este de : 0,042 μg pentru rT_3, de 3,0 μg pentru T_4 și de 0,16 μg pentru T_3.

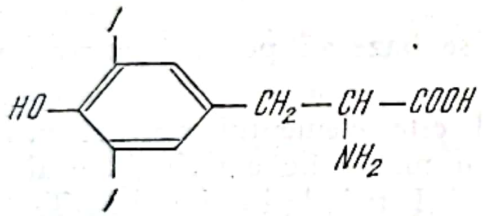
MIT și DIT cresc sau ocupă în exclusivitate biosinteza peptidelor iodurate în cazurile cu erori congenitale ale sintezei hormonilor tiroidieni.



Tirozină



MIT (3-monoiodotirozină)



DIT (3,5 - diiodotirozină)

Fig. II.4.1. Formula chimică a tirozinelor.

Rezerva de hormoni în tiroida normală este suficientă pentru două luni. Raportul tiroidă/ser este de aproximativ 20 pentru T_4 totală și de 6×10^5 pentru T_4 liberă; pentru T_3 totală raportul este de peste 600 și de $1,5—10^5$ pentru T_3 liberă (inclusiv cea rezultată din conversia T_4 la T_3).

La periferie, are loc deiodarea T_4 cu formarea T_3 în cantități aproape duble față de cele secretate direct de tiroidă; de aceea se crede că T_4 ar fi un prehormon pentru T_3 dar și pentru rT_3 (6).

În sînge, numai o infimă parte din T_4 este liberă, 99,95% circulă sub formă legată de proteinele transportoare și, anume 60% pe TBG (globulină care migrează electroforetic între α_1 și α_2-globuline), 30% pe TBPA (prealbumina) și 10% pe TBA (albumina). Restul de 0,05% adică 2,5—5,0 ngT_4/100 ml ser reprezintă T_4 liberă.

Afinitatea proteinelor de transport pentru T_3 este mai slabă. Majoritatea T_3 (99,85%) circulă sub forma legată la TBG, restul la TBA și TBPA. Concentrația T_3 libere reprezintă 0,15% din T_3 totală și este de 0,2—0,4 ng T_3/100 ml ser.

Semiviața T_4 este de 190 de ore, iar a T_3 de 19 ore. Degradarea T_4 pare să fie diferită în bolile tiroidei cu hiper- sau cu hipofuncție (7).

Activitatea hormonală este asigurată de forma liberă a T_3 și T_4, forma legată reprezentînd „rezerva" livrabilă la „cerere".

Activitate biologică

La vertebratele cu sînge cald, aproape toate organele și țesuturile sînt sub influența hormonilor tiroidieni T_4 și T_3. Procese organismice fundamentale ca creșterea, dezvoltarea, maturarea, reproducerea depind de starea funcțională a glandei tiroide.

Deficitul tiroidian la copil poate duce la menținerea caracteristicilor infantile și la nanism. Dacă glanda lipsește sau este nefuncțională, în timpul unei perioade critice de viață, de exemplu la nou-născut între 0 și 1 an, dezvoltarea mentală este perturbată și rezultă starea clinică numită cretinism. Dacă secreția tiroidiană lipsește și nu este corectată, apar întîrzieri în maturarea scheletică și în depunerea mineralelor în oase, iar mai tîrziu se manifestă și deficitul gonadic.

Scanned with OKEN Scanner

Unul din cele mai cunoscute efecte ale hormonilor tiroidieni este producerea de energie (căldură) și creșterea consumului de oxigen.

Acțiunea asupra maturării se evidențiază în mod spectaculos prin inducerea metamorfozei la mormoloc.

Efectele multiple ale hormonilor tiroidieni par să aibă o bază comună: acțiunea lor asupra acizilor nucleici și proteinelor (8).

Reglare și control

Reglarea funcției tiroidiene este prezentată în capitolul 2.

Marea majoritate a bolilor tiroidei reflectă fie hiper-, fie hipofuncția glandei: ele apar ca rezultat final al perturbării axei hipotalamus-hipofiză-tiroidă dar și al perturbării altor mecanisme de control, de exemplu imunitare sau nervoase (9).

Creșterea secreției hormonilor tiroidieni, care se manifestă clinic prin semne și simptome de *hipertiroidie*, poate fi datorită unei anomalii primar tiroidiene, de exemplu gușa nodulară, iar alteori (mult mai rar) unei producții crescute de TRH-TSH. Mai frecvent apare ca o consecință a stimulării tiroidei de către unele Ig din clasa IgG (LATS) și alte Ig anormale cu rol în apariția oftalmopatiei din boala Basedow. Inițial, se pare că hipersecreția implică T_3 și cînd aceasta persistă,

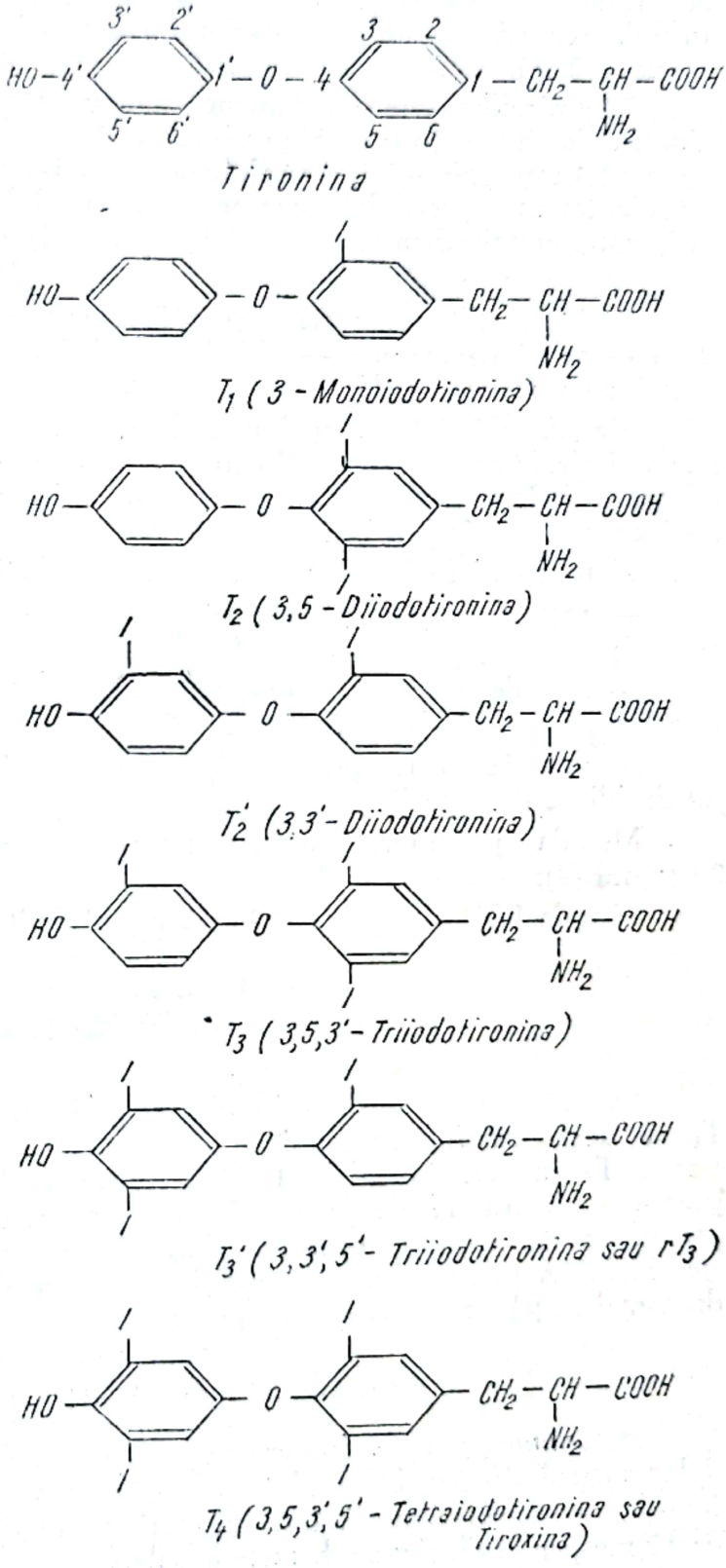


Fig. II.4.2. Formula chimică a tironinelor.

Scanned with OKEN Scanner

entitatea clinică se definește ca tireotoxicoză-T_3 (10, 11). În marea majoritate a cazurilor de hipertiroidie (70—80%) crește concentrația și a T_3 și a T_4.

Hipotiroidia primară apare mai ales ca o disfuncție tiroidiană asociată cu tiroidita autoimunitară, cu tiroidectomia parțială, cu terapia cu ^{131}I. Hipotiroidia secundară este o consecință a alterării stimulatorilor tiroidei și în special a TSH.

Hipotiroidia este un fenomen „nuanțat": granița dintre eutiroidie și hipotiroidie nu a fost încă precizată (12). Încercările de a clarifica „zona cețoasă" dintre hipo- și eutiroidie au dus la proliferarea termenilor: hipotiroidie latentă, preclinică, compensată, subclinică, ușoară, la limită, frustă, incipientă, premixedem etc.

Metode de cantificare

Înaintea metodelor RIA și RTA (radiotranzinanaliza), s-a recurs la două categorii de metode — chimice și biologice — folosite și astăzi pentru cantificarea în special a T_4.

Metoda *chimică* cea mai uzitată pentru determinarea concentrației hormonului tiroidian în sînge și în alte țesuturi se bazează pe tehnica de determinare a iodului legat organic, cu o sensibilitate de 0,01—0,05 μg de iod, după cromatografia prealabilă.

Metodele *biologice* se împart în trei categorii:

— metode bazate pe efectul asupra metamorfozei la mormolocul de broască;

— metode bazate pe capacitatea hormonilor tiroidieni de a crește consumul de oxigen *in vivo* și *in vitro;*

— metode bazate pe efectul antigușogen la animale hipotiroidizate cu antitiroidiene de sinteză.

Metoda pe mormoloc de broască poate măsura concentrații de 0,1 μg/ml (8).

Metoda RTA detectează 10—50 ng/ml de T_4 (13, 14).

4.1. TIROXINA (T_4)

85—90% din valoarea iodului organic (PBI) din circulație reprezintă T_4, de aceea determinarea PBI este folosită ca indicator indirect al concentrației T_4 în ser. Metodele RTA necesită prelucrarea prealabilă a serului pentru a elibera T_4 de proteinele de legare (tranzine) (13, 14, 15). Toate procedeele de extracție consumă timp și generează factori de eroare suplimentari. RIA permite măsurarea T_4 în serul ca atare (neprelucrat), în volume de numai 25 μl ser.

4.1.1. RADIOIMUNOANALIZA TIROXINEI

A. *Imunogenul.* Se folosește tiroglobulină umană izolată din țesut glandular normal (15, 16, 17), înglobată în adjuvant Freund.

B. *Antiserul.* Iepurii sînt injectați cu tiroglobulină umană în cantitate de 10 mg per doză, după schemele uzuale.

Scanned with OKEN Scanner

Antiserurile produse de animale diferite pot da procente ale legării T_4 mai mari sau egale cu legarea T_3. De aceea sînt selecţionate acele antiseruri care dau procente ale legării T_4 de cel puţin două ori mai mari decît pentru T_3 astfel încît T_3 nu intervine în sistemul RIA la concentraţii uzuale.

Antiserul diluat 1 : 60 diluţie iniţială dă o legare de 50% a unei cantităţi trasoare aproximativ 0,2 ng de ^{125}I-T_4 (17).

C. *^{125}I-Tiroxina* cu A.S. de 50—75 μCi/μg în propilenglicol 50% se obţine de la firme comerciale.

D. *Standardul.* L-T_4-Na substanţă RG[a] se cîntăreşte şi se dizolvă în NaOH 0,1 M şi apoi se diluează la concentraţia dorită în tampon, de exemplu în tampon veronal 0,075 M, pH=8,6 cu ser normal de iepure 2 ml% (15). Dizolvarea se mai poate face şi în NaOH 0,13 M în soluţie de alcool 70% şi se diluează în ser fără T_4 (18).

E. *Ser uman fără T_4* se prepară dintr-un amestec de seruri de la persoane eutiroidiene tratate cu estrogeni, în care se determină capacitatea de legare a TBG. O porţie din acest amestec se incubează peste noapte la temperatura camerei cu un exces (1,75 g/ml) de răşină schimbătoare de ioni de tip Amberlit IRA—400. La amestecul de ser cu răşină se adaugă tampon veronal în volum egal cu al serului, se amestecă, se lasă să sedimenteze şi se culege supernatantul. Supravegherea procesului de eliminare a T_4 cu ^{125}I-T_4 arată că peste 95% din ^{125}I-T_4 adăugat la amestecul de ser a fost absorbită de răşină (17).

Un alt procedeu de îndepărtare a T_4 din ser este cel prin adsorbţie pe cărbune (18), care va fi descris în paragraful 4.2 la descrierea RIA-T_3.

F. *Inhibitori ai legării T_4 pe tranzine.* Pentru a evita procedurile de prelucrare a probelor de ser de cercetat, se recurge la substanţe de tipul acid 8-anilin-1-naftalen sulfonic (ANS) adăugat în exces în toate eprubetele care conţin standard sau ser. ANS se prepară proaspăt în tampon veronal. ANS serveşte pentru:

— deplasarea T_4 de pe TBG pentru ca T_4 să devină măsurabilă în sistemul RIA;

— diminuarea legării ^{125}I-T_4 pe TBG;

— inhibarea legării T_4 şi a ^{125}I-T_4 la TBPA (15).

G. *Probele biologice.* Prelevarea sîngelui se face fără o pregătire specială a pacientului, în orice moment al zilei. Singura precauţie este ca să nu se fi administrat, în scop diagnostic sau terapeutic, substanţe radioactive, deoarece acestea pot interfera în sistemul de dozare. *Serul* este obţinut prin centrifugare şi este conservat la —20°C pînă la folosire.

Buletinul de însoţire trebuie să conţină unele informaţii utile:

— diagnosticul clinic cu specificarea hipo-, hiper- sau eutiroidie;

— terapia: intervenţie chirurgicală (totală, subtotală) şi data; ^{125}I- (doza şi data); antitiroidiene de sinteză, T_4, T_3, perclorat de potasiu, anticoncepţionale, steroizi CSR sau alţi steroizi;

— examene de laborator pentru funcţia tiroidiană: PBI, reflexograma etc.

Laptele se prelevează de la mame în *postpartum*, se centrifughează, grăsimile sînt îndepărtate şi probele se păstrează la —20°C pînă la folosire.

---

[a] Reagent grade.

Scanned with OKEN Scanner

H. *Incubarea reactivilor.* Volumul final al reactivilor este de 500 µl. Un exemplu de sistem RIA poate fi următorul (17):

— 300 µl tampon veronal 0,075 M care conţine ser de iepure normal 2%, ANS 50 mg/100 ml tampon şi ^{125}I-T_4 aproximativ 10 000 p/m (~0,2 ng/T_4);

— 100 µl din diferite diluţii de T_4 standard, de exemplu din diluţii între 0,5 şi 200 ng/ml pentru a avea în eprubete 0,05—20 ng distribuite în 10—14 puncte. Din probele de ser necunoscute se adaugă cîte 25 µl plus 75 µl tampon veronal cu ser de iepure normal 2% fără ANS, fără trasor; agitare;

— 100 µl ser de iepure anti-T_4 la diluţia 1 : 60, agitare;

— incubare o oră la temperatura ambiantă şi 5 minute pe baie de apă la 4°C; incubarea la 4°C se face pentru a pregăti faza de separare, care decurge în condiţii optime la această temperatură (15);

— ser anti-gamaglobulină suficient pentru a precipita gamaglobulinele introduse în sistem; incubare 20—24 ore la 4°C; centrifugare, sucţionare, citirea radioactivităţii legate şi calculul dozelor.

I. *Performanţele sistemului RIA*

Sensibilitatea: 0,3 ng/tub (25 µl dintr-un ser care conţine 12 ng T_4/ml).

Specificitatea: tiroglobulina umană interferează în sistem numai la concentraţii de 1 µg/tub de dozare (17); analogi de tipul D-T_4 interferează 100% în sistem, triiodotironinele (L-T_3 şi D-T_3) interferează în proporţie de 10 şi respectiv de 20% (15). Celelalte tironine şi tirozinele (MIT şi DIT), practic, nu intervin în sistemul RIA-T_4.

Precizia apreciată ca variabilitate intraserie este de 3—5% iar interserii (reproductibilitatea) este de 7—10%.

4.1.2. APLICAŢII CLINICE ŞI REZULTATE

Comparativ cu tehnica RTA, RIA-T_4 dă aceleaşi rezultate dar este mai simplă. Cu toate acestea, ţinînd seama că indicaţii utile, dar indirecte, asupra concentraţiei T_4 în ser pot fi obţinute cu o tehnică chimică simplă ca PBI, indicaţiile clinice ale determinării RIA-T_4 sînt relativ puţine. RIA-T_4 este rezervată pentru situaţiile în care proba de ser este contaminată cu iod exogen şi pentru cazurile în care apar concentraţii excesive de substanţe bogate în iod provenind din tiroida proprie, altele decît T_4 ca de exemplu în tiroidite sau postiradiere cu radioiod.

Concentraţia T_4 în µg/100 ml *ser* este la eutiroidieni de 4—12, la hipertiroidieni de 12—45 şi la hipotiroidieni de 2—5 (17).

La persoanele tratate cu estrogeni, concentraţia T_4 în ser seamănă cu valorile observate la hipertiroidieni. Concentraţia T_4 în ser poate fi fals crescută la bolnavi trataţi cu D-T_4. Terapia cu antitiroidiene de sinteză scade nivelul seric al T_4.

In laptele matern, concentraţia T_4 este de $0{,}38 \pm 0{,}07$ µg/100 ml (media $\pm$ eroarea standard) în prima săptămînă *post partum*, creşte la $4{,}27 \pm 0{,}50$ între 8 şi 48 de zile, şi scade după 50 de zile la $1{,}11 \pm 0{,}25$. Aceste date sugerează că laptele matern poate fi o sursă importantă de hormon tiroidian exogen pentru nou-născut (19).

Scanned with OKEN Scanner

4.2. TRIIODOTIRONINA (T_3)

Odată cu descoperirea sindromului numit tireotoxicoza T_3 (20), în care fenomenele clinice sînt datorite unei secreţii excesive în special a T_3, măsurarea acestui hormon în clinica umană printr-o tehnică simplă şi rapidă devine absolut necesară. Metodele propuse de pionierii determinării T_3 în ser anume RTA (21, 22) şi gaz-lichid-cromatografia (20), sînt metode laborioase şi care dau valori mari ale concentraţiei T_3. Obţinerea anticorpilor anti-T_3 folosind ca imunogen un conjugat de poli-L-lizină-T_3 (23) a încurajat dezvoltarea sistemelor de radioimunoanaliză a T_3 (16, 18, 24, 25).

4.2.1. RADIOIMUNOANALIZA 3,5,3'-TRIIODOTIRONINEI

A. *Imunogenul.* T_3 în forma acidă este supusă repurificării repetate prin cromatografie pe hîrtie în sistem alcool amilic-hexan-amoniac (22) în prezenţa unor cantităţi trasoare de ^{125}I-T_3. După purificare, T_3 este cuplată direct cu albumină serică bovină, umană, sau ovalbumină, de exemplu după procedeul următor (18): 50 mg de T_3 purificată de 5 ori prin cromatografie este dizolvată în 2,5 ml NaOH, 0,15 N şi se adaugă sub agitare la o soluţie de albumină serică bovină 100 mg în 5 ml apă distilată; se adaugă apoi 300 mg carbodiimidă agitînd continuu şi pH soluţiei este adus la 9,0, cu HCl; amestecul este incubat peste noapte la 4°C dializat 5 zile faţă de 6 litri de apă distilată schimbată zilnic.

B. *Antiserul.* Imunogenul, emulsionat în adjuvant Freund complet este administrat intradermic în doze de 0,75 mg. Injecţiile de rapel se repetă pînă se obţine un antiser adecvat pentru RIA-T_3. Titrul, testat în prezenţa ^{125}I-T_3, poate fi de ordinul a 1 : 20 000 diluţie iniţială (25).

C. *^{125}I-T_3.* Hormonul marcat cu A.S. aproximativ 100 Ci/μg, obţinut pe cale comercială este folosit ca atare sau repurificat prin cromatografiere. Înainte de folosire este diluat în tampon veronal 0,08 M cu albumină serică bovină 1 g/litru, pentru o concentraţie de 30 pg/100 μl diluent.

Menţionăm că ^{125}I-T_3 serveşte şi pentru calculul indicelui T_4 liberă care este numit uneori şi testul-T_3 confundat adesea cu dozarea T_3.

D. *Standardul.* T_3 obţinut pe cale comercială sub forma de acid liber este dizolvat în alcool-HCl 1 N (2 : 1, v/v). Se prepară concentraţii progresiv crescătoare de T_3 standard în ser fără T_3 şi T_4, de exemplu 0,5 1, 2, 4, 8 şi 16 ng T_3/ml.

E. *Ser fără T_3.* Vezi 4.1.1.E.

F. *Mediul de incubare.* Pentru a inhiba legarea T_3 la proteinele serice se foloseşte tampon veronal şi ANS (acid 8-anilin-naftalen sulfonic) în concentraţii alese în funcţie de diluţia serului: de exemplu 175 μg/0,2 ml pentru ser diluat 1 : 4 şi 350 μg/0,2 ml, pentru ser diluat 1 : 2.

G. *Probele biologice.* Vezi 4.1.1. G.

H. *Incubarea reactivilor.* Vezi 4.1.1. H.

I. *Performanţele sistemului RIA*

Sensibilitatea. Un sistem RIA poate detecta concentraţii de 0,2 ng/ml.

Specificitatea. În sistemele RIA-T_3 cu antiser specific, nu interferează compuşi de tipul L-T_4, D-T_4, L-3, 5-diiodotironina, DIT sau MIT (25).

Precizia. Coeficientul de variabilitate intra-serie este de 3—5% iar inter-serii de 6—10% pentru valorile observate la normali.

Scanned with OKEN Scanner

Măsurarea T_3 prin metoda RIA este indicată ori de cîte ori testele de *screening* nu concordă cu diagnosticul clinic de hipertiroidie:

— dacă bolnavul prezintă semne clinice de tireotoxicoză iar testele de screening dau valori normale sau la limită;

— dacă bolnavul are exoftalmie iar rezultatele testelor de screening sînt normale sau indică o hipertiroidie ușoară.

Dozarea T_3 nu este utilă în hipotiroidie, în care dozarea TSH este mult mai semnificativă. Nu se dă indicație pentru RIA T_3 cînd testele de screening confirmă un diagnostic clinic de tireotoxicoză (20).

Valorile T_3 obținute la eu-, hiper- și hipotiroidieni și în sarcina normală sînt redate în tabelul II.4.1. (25).

Tabelul II.4.1.

Concentrația T_3 în serul persoanelor eu-, hiper- și hipotiroidiene și în sarcina normală (referința 25)

Categoria clinică	T_3 ng/100 ml	
	Media ± DS	Limite
Eutiroidieni — bărbați	115±23	71—160
Eutiroidieni — femei	115±26	68—160
Sarcină	168±23	136—237
Hipotiroidie cu T_4 și indice T_4 liberă scăzută	—	sub 18—171
Hipertiroidie	429±252	168—1530

4.3. R-TRIIODOTIRONINA (rT_3)

Triiodotironina răsturnată (reverse T_3, rT_3 sau T_3') (fig. II.4.2) devine importantă din punct de vedere clinic odată cu studiile privind conversiunea periferică a T_4 la T_3 și rT_3 (fig. II. 4. 3). Se crede că atomii de iod din inelele fenolic și tirozilic din molecula de T_4 sînt îndepărtați la întîmplare, cu o rată similară, rezultînd formarea 3, 5, 3' -T_3 cînd monodeiodinarea apare *întîi* în inelul *fenolic* sau 3,3'-5'-T_3 (rT_3) cînd monodeiodinarea apare întîi în inelul tirozilic (27).

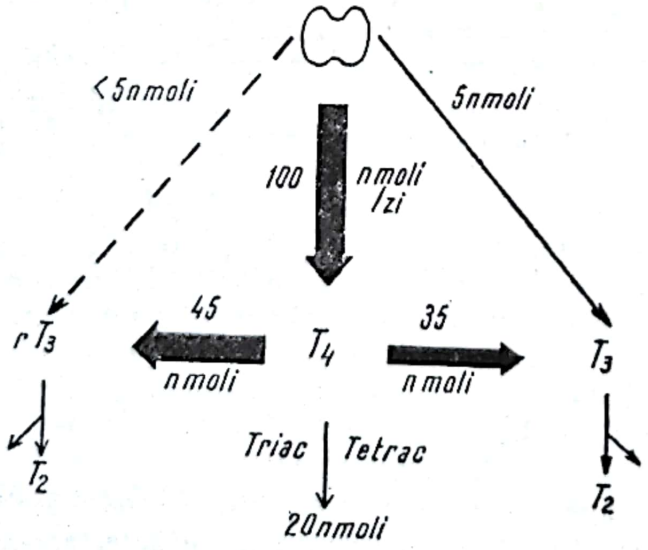


Fig. II.4.3. Reprezentare schematică a metabolismului hormonilor tiroidieni (referința 12). (Triac = acid triiodotiroacetic; Tetrac = acid tetraiodotiroacetic).

Sistemele RIA pentru T_3 sînt un instrument util pentru studiile asupra conversiunii T_4 la T_3. Radioimunoanaliza rT_3, dezvoltată ulterior, permite confirmarea T_4 ca sursă importantă și pentru rT_3 (5, 68).

Scanned with OKEN Scanner

A. *Imunogenul.* D, L-rT_3 este conjugată cu albumină serică umană prin metoda de condensare cu morfo-CDI după următorul procedeu (5). La 25 mg de albumină serică umană dizolvată în 12,5 ml tampon fosfat salin (0,14 M NaCl, 0,01 M fosfat de sodiu, pH=7,5) se adaugă cu agitare 9 mg D, L-rT_3 dizolvată într-un amestec de 2 ml de dimetilformamidă şi 2 picături de NaOH 0,4 M, 1 ng de ^{125}I-T_3 şi 15 mg Morfo-CDI; pH-ul este ajustat la 7,5 cu HCl diluat. După 10 minute se mai adaugă 5 mg de morfo-CDI. Reacţia continuă la temperatura ambiantă, la întuneric, timp de 18 ore, cu agitare. Amestecul de reacţie este dializat la rece faţă de 4 litri de apă distilată o dată, apoi de 3 ori cîte 4 litri/24 de ore şi conjugatul rămas în sacul de dializă este îngheţat la —20°C. În aceste condiţii experimentale, 50% din ^{125}I-T_3 apare incorporat în conjugat. Experienţa repetată cu ^{125}I-rT_3 arată o încorporare de 37% a trasorului în conjugat (5). Sînt folosite şi conjugate ale L-rT_3 cu albumina serică bovină, cu randament de încorporare similar (aproximativ 40%) (28).

B. *Antiserul.* Un ml de conjugat care conţine 1 mg albumină serică umană este omogenizat cu 1 ml de adjuvant Freund şi inoculat la iepuri. Se administrează injecţii de rapel pînă se obţine un antiser convenabil.

Antiserul obţinut cu conjugate L-rT_3-albumină serică bovină are titrul iniţial de 1 : 1 000 (final 1 : 5 000) (28).

C. *^{125}I-rT_3* se prepară prin iodurarea 3, 3′-L-triiodotironinei după metoda cu cloramină-T modificată (6). Se obţine 3, 3′, 5-L-r-triiodotironină iodurată, cu activitate specifică de 350—400 μCi/μg (28). Separarea de ^{125}I-T_2 şi de iodura liberă se face pe coloană de Sephadex G—25 superfin.

D. *Standardul* poate fi D-L-rT_3 (5) dar pare preferabil L-rT_3 (28). Curba este interpolabilă între 0,1 şi 5 ng/ml.

E. *Condiţiile de incubare.* Mediul de incubare poate fi tampon veronal 0,075 M, tampon fosfat salin sau tampon borat 0,2 M, pH=8,5, albuminat. Timpul de incubare este de aproximativ 20—24 de ore, la +4°C (5) sau la temperatura camerei (28).

F. *Separarea complexelor anticorp* — ^{125}I-L-T_3 legată de ^{125}I-L-T_3 liberă se face prin precipitare cu sulfat de amoniu.

G. *Probele biologice.* Folosirea ANS (acid 8-anilin-naftalen sulfonic) 300 μg/eprubetă (28) permite dozarea rT_3 în serul neprelucrat.

H. *Schema orientativă de dozare:* 200 μl „premix", 100 μl ser anti-L-rT_3, 100 μl standard sau ser de cercetat şi 100 μl de ser fără hormoni tiroidieni. Conţinutul eprubetelor este omogenizat prin agitare pe Vortex, apoi se incubează 18—24 de ore la temperatura ambiantă. Urmează separarea cu sulfat de amoniu, citirea radioactivităţii şi calculul rezultatelor (28).

„Premix"-ul constă din ^{125}I-L-rT_3 (aproximativ 10 pg per 200 μl) în 50 ml de tampon borat 0,2 M cu ANS 15% (greutate / volum) (28).

Ser cu conţinut scăzut de rT_3 sau ser hipotiroidizat (28) se obţine prin tratarea unui amestec de seruri umane cu 500 mg răşină (Rexyn) per ml (29).

I. *Performanţele sistemului RIA-rT_3*

Sensibilitate: 0,1 ng/ml, adică 10 ng/100 ml (28).

Scanned with OKEN Scanner

Specificitate: sistemul recunoaşte în mod egal L-rT_3 şi D, L-rT_3. Toţi ceilalţi compuşi tiroidieni iodurati inclusiv L-T_3, interferează în sistem în procente mai mici de 1%.

Precizia: cv% intraserie este de aproximativ 3%, iar interserii nu trece de 10—12% (28).

4.3.2 REZULTATE

A. *Condiţii bazale*

La eutiroidieni, concentraţia serică a rT_3 variază între 30 şi 80 ng/100 ml; la hipotiroidieni, variază între valori la limita de sensibilitate a tehnicii (10 ng/100 ml) pînă la 50—60 ng/100 ml, iar la hipertiroidieni concentraţia creşte în limite între 50 şi peste 250 ng/100 ml.

B. *Situaţii fiziologice*

În sarcina normală la termen, concentraţia rT_3 seric este de 80—160 (28) similară cu cea observată în cordonul ombilical (5).

C. *Probe farmacologice*

T_4. Administrarea unei tablete de 0,4 mg de L-T_4 (verificată prin RIA că nu conţine rT_3) creşte concentraţia plasmatică a rT_3 la pacienţi atireotici de la 25 ng/100 ml la peste 100 ng/100 ml, ceea ce arată că rT_3 măsurat derivă din conversiunea T_4 (28).

TSH şi TRH. Administrarea TSH la eutiroidieni nu modifică concentraţia rT_3 în ser, deşi TRH provoacă creşteri semnificative (28).

4.4. DIIODOTIRONINA (T_2)

Aşa cum T_4 se transformă, prin deiodinare, în T_3 şi rT_3, tot aşa la rîndul lor, aceşti hormoni pot fi metabolizaţi cu apariţia T_2 în circulaţia periferică. Pentru studiul producţiei, fiziologiei şi eliminării a fost dezvoltat un sistem RIA pentru 3, 3′-T_2 în serul neprelucrat (6).

4.4.1. RIA-3,3'-T_2

A. *Imunogenul.* 3, 3′-L-diiodotironină cuplată cu albumină serică bovină (28) este emulsionată în adjuvant Freund complet.

B. *Antiserul.* Iepuri New Zealand sînt injectaţi intradermic cu doze de aproximativ 50 μg 3, 3′-T_2 (1, 5—2 mg conjugat), v/v cu adjuvant Freund. Antiserul selecţionat este folosit la acea diluţie care leagă 30—50% din trasor; această diluţie poate fi de 1 : 300 diluţie iniţială, 1 : 1 500 diluţie finală (6).

C. *^{125}I-3, 3′-T_2* se obţine în laborator (28) sau de la producători de compuşi marcaţi.

D. *Standardul:* se folosesc concentraţii crescătoare de 3,3′-diiodotironină, între 0,1 şi 10 ng/ml (0,01—1,0 ng/eprubetă).

E. *Ser fără iodotironine* se prepară din amestec de ser sau plasmă umană tratat cu răşină (500 mg/Rexyn) per ml ser (28).

F. *„Premix"* este un amestec de ^{125}I-3,3′T_2 (aproximativ 30—50 pg L-3,3′T_2 per ml) cu ANS (acid 8-anilin-naftalen-sulfonic) 0,30% (greut/vol) în tampon borat 0,2 M, pH=8,5.

Scanned with OKEN Scanner

G. *Schema de lucru:* 100 µl „premix", 100 µl ser anti- 3, 3′ T_2, 100 µl standard sau ser de cercetat, 100 µl ser fără iodotironine şi 100 µl tampon borat cu albumină serică bovină 0,5 g%, se incubează la temperatura ambiantă 18—24 de ore. Separarea se face cu sulfat de amoniu (6, 28).

H. *Performanţele sistemului RIA* (6)

Sensibilitatea: 6,25 ng/100 ml.

Specificitatea: interferenţa în sistem este sub 0,1% pentru toate substanţele iodurate din tiroidă.

Precizia: CV% intra- şi interserii este de 10—20%.

4.4.2. REZULTATE (6)

La eutiroidieni, concentraţia 3,3′-T_2 în ser este în limite de 10—30 ng/100 ml.

În hipotiroidie, concentraţia 3, 3′-T_2 în ser se plasează între limita de sensibilitate a tehnicii şi aproximativ 20 ng/100 ml. La hipertiroidieni nivelul seric al T_2 se situează la limita superioară a valorilor observate la normali.

4.5. DIIODOTIROZINA (DIT)

4.5.1. INTRODUCERE

Sinteza hormonilor tiroidieni implică iodinarea reziduurilor de tirozină în molecula de tiroglobulină pentru a forma MIT şi DIT, urmată de cuplarea a două iodotirozine pentru a forma fie T_3, fie T_4.

Secreţia hormonilor tiroidieni implică proteoliza tiroglobulinei pentru a furniza aminoacizi iodurați liberi în tiroidă. Iodotironinele libere T_3 şi T_4 sînt secretate în circulaţie.

Iodotirozinele libere MIT şi DIT sînt deiodinate în celula epitelială de o dehalogenază specifică iodotirozinelor, care lasă iodul lor disponibil pentru a reintra în procesul sintezei hormonilor tiroidieni. Se crede că această deiodinare tiroidiană este aşa de completă încît nu se mai eliberează iodotirozine din tiroidă în circulaţie şi deci ele nu apar în sînge. Totuşi, concentraţia plasmatică a iodului total legat organic este mai mare decît concentraţia iodului hormonal, iar eliberarea iodului tiroidian total este mai mare decît conţinutul de iod al hormonilor tiroidieni secretaţi. În acest caz, se poate presupune că şi iodotirozinele pot fi eliberate din tiroidă.

Metodele cromatografice de măsurare a iodotirozinelor sînt laborioase şi dau rezultate discordante. De aceea, dezvoltarea unei metode RIA cu legare multiplă a ligandului permite clarificarea prezenţei iodotirozinelor în circulaţie şi a naturii iodului nehormonal eliberat din tiroidă (30).

4.5.2. RADIOIMUNOANALIZA DIT CU LEGARE MULTIPLĂ A LIGANDULUI

Ţinînd seama că T_3 şi T_4 ar putea interfera legarea DIT la anticorp, se recurge la un sistem RIA în care se adaugă TBG, care leagă T_3 şi T_4 nu şi iodotirozinele (30).

A. *Imunogenul.* Se foloseşte un conjugat de 3,5-diiodo-L-tirozină (L-DIT) cu tiroglobulină porcină (Tgl-p) preparat prin metoda de condensare cu etil-carbodiimidă.

B. *Antiserul.* Iepuri femele New Zealand, adulţi tineri, primesc 1 mg imunogen în 1 ml NaCl 0,15 M tamponat cu fosfat 0,01 M (TF salin), emul-

Scanned with OKEN Scanner

sionat în 1 ml adjuvant Freund complet, în injecţii intradermice în multiple locuri. Se fac rapeluri la intervale de 10—14 zile pînă ce antiserul obţinut are un titru satisfăcător. Testarea antiserului se face în următoarele condiţii: 100 µl antiser diluat, 50 µl ^{125}I-DIT (10 000—20 000 p/m), 100 µl EDTA 0,1 M în TF salin, 750 µl ser iepure normal 2% în TF salin, incubare 24 de ore la 4°C, separare, centrifugare, citire.

Se selecţionează antiserul cu un titru convenabil, de exemplu antiserul, care la diluţia iniţială de 1 : 100, leagă 35—60% ^{125}I-DIT.

C. *^{125}I-DIT* se obţine pe cale comercială.

D. *Standardul* este L-DIT.

E. *Ser fără DIT.* Un amestec de seruri umane este tratat cu răşină schimbătoare de ioni, de exemplu cu Rexyn 450 grame la litrul de ser, supraveghind îndepărtarea DIT cu trasor DIT. Serul astfel tratat este un ser fără DIT, cu o concentraţie redusă de T_3 şi T_4 şi serveşte ca furnizor de TBG. Înainte de folosire se reconstituie concentraţia iniţială a electroliţilor captaţi pe răşini. În amestecul de incubare se adaugă de exemplu 400 µl de ser fără DIT pentru a lega T_3 şi T_4.

F. *Tehnica de separare.* Se poate folosi tehnica cu dublu anticorp, dar al doilea anticorp trebuie tratat în prealabil ca şi serul fără DIT. Este preferabilă totuşi separarea prin precipitare cu polietilenglicol (PEG), deoarece tehnica cu dublu anticorp deformează uneori curba standard.

G. *Specificitatea sistemului RIA.* În absenţa TBG, T_4, MIT, 3, 5-diiodotironina şi T_3 reacţionează încrucişat în proporţie de 0,5—0,1%. Tiroglobulina, Tetrac şi T_2 reacţionează încrucişat sub 0,1%. Acidul hidroxi-3,5-diiodofenil piruvic reacţionează aproape de 1% (30).

H. *Sensibilitatea:* 40 ng/100 ml (31).

4.5.3. REZULTATE

În tabelul II.4.2. sînt prezentate datele asupra concentraţiei DIT în serul persoanelor sănătoase şi al celor cu boli ale glandei tiroide. Se observă variaţii intraindividuale în limite largi: 80—320 ng/100 ml (30).

S-a observat că concentraţia DIT este mai mare în sîngele venos decît în cel arterial deci se eliberează DIT din tiroidă; dar şi în serul bolnavilor cu tiroidectomie totală netratată se găseşte DIT, ceea ce sugerează surse extratiroidiene de DIT (30).

După administrarea a 10 mg DIT se observă creşterea concentraţiei serice la 12 000 ng/100 ml în 60 minute, apoi scade exponenţial cu $T^1/_2$ de 102 minute.

Concentraţia DIT nu prezintă fluctuaţii diurne şi nici nu creşte postprandial.

Se pare că DIT contribuie numai cu 1% la iodul măsurat ca PBI, deoarece numai 60% din DIT seric este precipitabil cu TCA. De aceea, se presupune că o parte din DIT circulant este vehiculat de polipeptide mici cu GM sub 750.

Dispariţia rapidă din circulaţie a DIT exogen pare să fie datorită preluării lui de către glanda tiroidă. Ar rezulta că concentraţia DIT în circulaţie este o *rezultantă* a DIT eliberat din tiroidă şi a recaptării sale de către tiroidă (30).

Scanned with OKEN Scanner

4.6. TIROGLOBULINA

4.6.1. INTRODUCERE

Proteinele tiroidei se deosebesc de proteinele altor glande şi ţesuturi prin participarea lor directă la biosinteza hormonală. Componenta majoră a iodoproteinelor tiroidiene este tiroglobulina (Tgl), care funcţionează ca loc de sinteză şi de depozit al hormonilor tiroidieni. Tgl este o glicoproteină cu GM de 660 000 şi coeficient de sedimentare 19S (32, 33). În alcătuirea moleculei intră hidraţi de carbon în proporţie de 10%. În mod normal, numai 25 din cele 140 de reziduuri de tirozină ale Tgl sînt iodinate. Tgl precipită la punctul izoelectric (pH=4,5), suferind o denaturare ireversibilă (32, 33). La electroforeză, Tgl migrează în zona alfaglobulinelor.

Tabelul II.4.2.

Concentraţia DIT în serul persoanelor sănătoase şi al pacienţilor cu boli tiroidiene (referinţe 30, 31)

Grup	Vîrsta (ani)	DIT ng/100 ml		Semnificaţia „p"
		Media	Limite	
Sănătoşi ambele sexe	20—70		ND—430	
	20—29		120—160	
	30—39		80—120	
	40—49		70—90	
	peste 50		40—60	
	20—39	120		< 0,01
	40—70	70		
bărbaţi			30—220	NS[a]
femei			30—430	
Sarcină trim. III		75		
Boala Basedow		150	40—850	
Hipotiroidie		105	25—500	
Hashimoto		90	40—180	
Guşă multinodulară cu eutiroidie		120	25—350	

a) = nesemnificativ

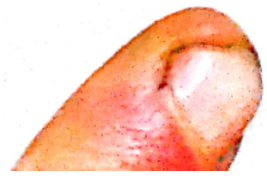
Studiile imunochimice arată că tiroglobulinele diferitelor specii sînt structural înrudite, deci tiroglobulina are specificitate de organ nu şi de specie.

Pentru izolarea Tgl din tiroidă ea trebuie eliberată din locul său de depozit (lumenul foliculului tiroidian) prin omogenizarea ţesutului glandular. Metodele de extracţie şi de purificare sînt metode de precipitare cu sulfat de amoniu (33, 34, 35) urmate de cromatografie pe gel de dextran G—200 (33, 36, 37) sau pe gel de amidon (38).

Tgl este relativ instabilă şi nici una din metodele uzuale de conservare, inclusiv liofilizarea, nu oferă suficiente garanţii.

Interesul pentru Tgl creşte odată cu descoperirea autoanticorpilor anti-Tgl (39). Cercetările sînt axate pe structură, proprietăţi fizicochimice, biosinteza şi eliberarea Tgl (40, 41, 42, 43, 44, 45).

Observaţiile asupra prezenţei Tgl în 50% din serurile de la gravide şi în 75% din serurile nou-născuţilor prin metoda de inhibiţie a hemaglu-



Scanned with OKEN Scanner

tinării (46) demolează mitul Tgl încastrată în foliculul tiroidian ca sursă a intoleranței imunitare față de această moleculă.

În ultimii ani, măsurarea Tgl în ser, prin metoda RIA, tinde să devină o metodă de detectare precoce a metastazelor țesutului tiroidian.

4.6.2. SISTEME RIA PENTRU MĂSURAREA Tgl

Au fost dezvoltate sisteme RIA în fază lichidă (47, 48, 49, 50, 51, 52) și în fază solidă (53). Sistemele RIA în fază solidă par să aibă avantajul că pot măsura Tgl și în prezența anticorpilor.

A. *Imunogenul.* Tgl umană obținută prin extracție cu sulfat de amoniu (51), purificată prin cromatografie pe DEAE celuloză (52), pe Sephadex G—200 (36) sau prin cromatografie de afinitate (49), se injectează la iepure după emulsionare în adjuvant Freund. După 3—5 injecții cu doze de 1—5 mg Tgl, se obțin titruri convenabile de anticorpi. Antiseruri cu afinitate sporită sînt obținute prin inocularea animalelor cu arcurile de precipitare obținute la imunoelectroforeza Tgl cu ser anti-Tgl.

B. *Antiserul.* Diluții progresive de antiser sînt testate în prezența Tgl marcată cu ^{125}I. Se selecționează acele antiseruri care la diluții de peste 1 : 50 000 leagă 40—60% din cantitatea de trasor (fig. II.4.4.).

C. *^{125}I-Tgl.* 10 µl din soluția de Tgl foarte purificată cu concentrația în proteine de 1mg/ml prin metoda Lowry, se marchează cu ^{125}I prin metoda cu cloramina-T, cu timp de contact de 30 de secunde. Amestecul de marcare este purificat pe o coloană de Sephadex-G-50 fin, cu dimensiunile de

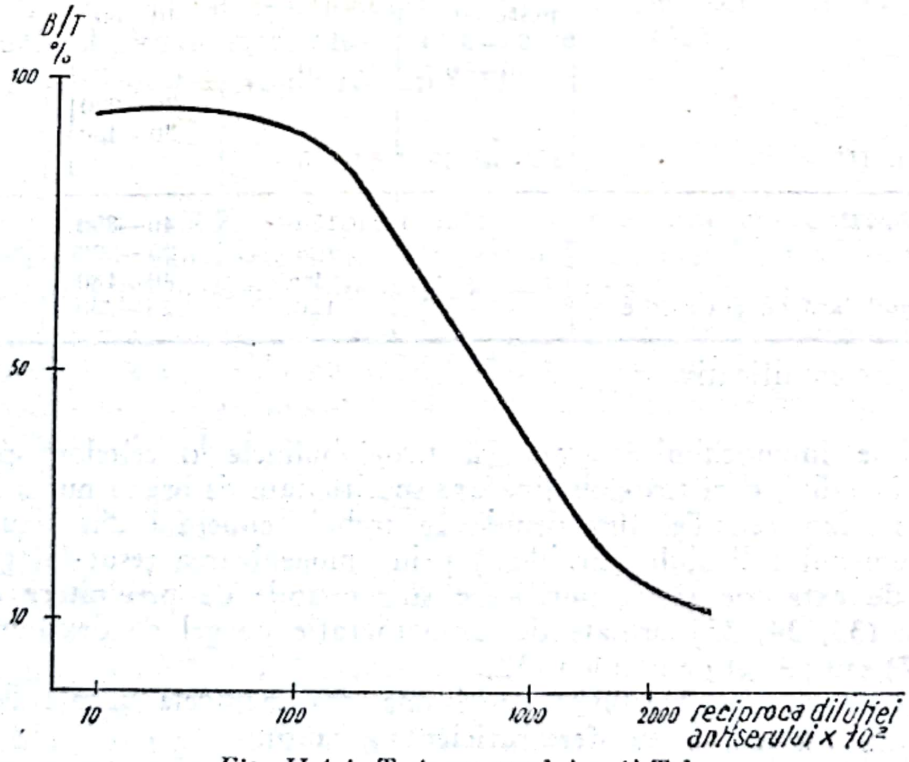


Fig. II.4.4. Testarea serului anti-Tgl.

250/10 mm echilibrată cu tampon fosfat 0,025 M, pH=7,5. Se culeg 35 eluate a 1 ml. ^{125}I-Tgl cu radioactivitate maximă apare în eluatele 7 și 8, iar radioactivitatea liberă apare începînd cu eluatul 25. Eluatele 7 și 8, ca și produsul total de marcare, sînt testate prin precipitare cu acid triclor-

Scanned with OKEN Scanner

acetic (tabelul II. 4.2.), radiocromatografia şi precipitare în exces de anticorp (tabelul II.4.3.). Porţii suficiente din eluatele 7 şi 8 sînt diluate astfel încît să se obţină 5 000—10 000 p/m, per 100 µl. Restul de Tgl marcată se conservă prin congelare la —20°C diluată în tampon fosfat albuminat. ^{125}I-Tgl rămîne stabilă aproximativ două săptămîni.

D. *Tgl standard.* Probabil din cauza instabilităţii Tgl în stare lichidă şi a denaturării sale prin liofilizare, nu s-a obţinut încă un preparat stan-

Tabelul II.4.3.

Verificarea randamentului marcării şi a purităţii Tgl marcată prin precipitare cu TCA în exces de anticorp

Proba	% precipitare TCA	B/T%
Amestec marcare	45,50	—
eluat 7	95,94	87,19
8	94,54	100

dard. S-ar putea folosi plasma cu concentraţie cunoscută de Tgl. Lipsa unui standard face ca rezultatele determinării Tgl în lichidele biologice să nu fie concordante.

E. *Probele biologice.* Nu se cunosc modificările concentraţiei Tgl în condiţii fiziologice: alimentaţie, ritmicitate circadiană etc. De aceea, probele sînt recoltate pentru stabilirea valorilor bazale, dimineaţa pe nemîncate. Serul este separat de cheag şi conservat prin congelare.

F. *Incubarea reactivilor.* Volumul total de incubare este de 300—500 µl, în mediu de tampon fosfat 0,04 M, pH=7,4. Incubările se fac la +4°C, folosind tehnica cu sau fără preincubare.

G. *Separarea complexelor legate* se face prin metoda cu dublu anticorp.

H. *Performanţele tehnicii.* Sensibilitatea este de 2,5 ng/ml; antiserul nu reacţionează încrucişat cu T_4 sau cu T_3 la diluţia folosită în sistemul de dozare. Precizia intraserie este de 4—6% (CV).

I. *Truse.* Nu sînt disponibile truse comerciale pentru RIA-Tgl. Dintre *reactivi*, ser anti-Tgl, standard şi produs pentru marcare, se află disponibil în Institutul de endocrinologie, laboratorul RIA.

4.6.3. REZULTATE

Concentraţia serică a Tgl observată la normali şi în diferite boli ale tiroidei este redată în tabelul II. 4.4.

Imediat postoperator, concentraţia Tgl creşte la 10—30 µg/ml la bolnavi cu boala Basedow supuşi tiroidectomiei subtotale. La aceste concentraţii Tgl a putut fi detectată cu ani în urmă şi prin metode imunochimice.

Importantă pentru clinician este urmărirea sistematică a concentraţiei Tgl la bolnavi cu cancer diferenţiat supuşi tiroidectomiei totale, ca un mijloc de detectare a procesului de metastazare în fază incipientă.

Unele discrepanţe între valorile RIA ale Tgl şi ale hormonilor tiroidieni şi starea clinică a bolnavilor sînt generate uneori de prezenţa autoanticorpilor tiroidieni în serul bolnavului (55).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.4.4.

Concentrația Tgl în serul persoanelor normale și în tireopatii, în condiții bazale

Grup	Nr.	Tgl ng/ml	Referințe
Normali	25	ND[a]—50	(53)
California	—	5,1 ±0,49	
Noua Guinee	84	163,1 ±17,2	
Normali	—	69,2 ±37,2	(54)
Normali	—	0—30 (50 % ND)	(50) (48)
Normali	—	10—180	(49)
Guşă	23	37,9 ±87,0	(53)
Guşă Noua Guinee	77	208,1 ±19,8	(54)
Basedow netratat	9	324,3 ±517,8	(53)
tratat	27	71,0 ±138,6	(53)
Hashimoto	10	172,5 ±314,5	(53)
Adenom	13	136,0 ±146,0	(53)
Cancer tiroidian	8	15,0 ±14,1	(53)
Cancer tiroidian diferențiat preoperator	10	22—445 (144,3 ±46,5)	(47)
postoperator	7	6,4 ±1,5	(47)
tratament reușit	43	4,9 ±0,51	(47)
metastaze	6	464,9 ±155,6	(47)

a) = nedozabil

BIBLIOGRAFIE

1. **Pitt-Rivers R., Trotter W. R. (editori)** — The Thyroid Gland, Butterworth & Co. (Publishers) Ltd., Londra, 1964.
2. **Negoescu I., Constantinescu A., Heltianu C.** — Biochimia hormonilor tiroidieni, Ed. Acad. R.S.R., București, 1971, 226 pag.
3. **Rall J. E. (editor)** — The Thyroid, North-Holland Publishing Co., Amsterdam — Londra, 1972, vol. 1, 303 pag.
4. **Ingbar S. H., Woeber K. A.** — În: „Textbook of Endocrinology" ed. V (editat de R. H. Williams), Saunders Company W. B., Philadelphia, 1974, 95 pag.
5. **Chopra I. J.** — J. clin. Invest., 1974, *54*, 583.
6. **Burman K. D., Strum D., Dimond R. C., Djuh Y. Y., Wright F. D., Earli J. M., Wartofsky L.** — J. clin. Endocr., 1977, *45*, 339.
7. **Negoescu I., Constantinescu A., Don M., Heltianu C.** — Rev. Roum. Endocrinol., 1970, *4/7*, 349.
8. **Frieden E. H.** — Chemical Endocrinology, Academic Press Inc., New York, 1976.
9. **Negoescu I., Constantinescu A., Balan M., Stanciu H., Simescu M.** — Rev. Roum. Endocrinol., 1971, *8/3*, 255.
10. **Sterling K., Refetoff S., Selenkow H. A.** — J. Amer. med. Ass., 1970, *213*, 571.
11. **Holander C. S., Mitsuma T., Nihei N., Shenkman L., Burdaz S. Z., Blum M.** — Lancet, 1972, *1*, 609.
12. **Hesch R. D.** — În: „Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31. X. — 4. XI. 1977.
13. **Murphy B. E. P., Patee C. J.** — J. clin. Endocrinol., 1961, *21*, 187.
14. **Murphy B. E. P.** — J. Lab. clin. Med., 1965, *66*, 161.
15. **Chopra I. J., Solomon D. H., Ho R. S.** — J. clin. Endocr., 1971, *33*, 865.
16. **Chopra I. J., Nelson J. C., Solomon D. H., Beall G. N.** — J. clin. Endocr., 1971, *32*, 299.

Scanned with OKEN Scanner

17. **Chopra I. J.** — J. clin. Endocr., 1972, *34*, 938.
18. **Hollander C. S., Shenkman L.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press Inc., New York, 1974, p. 215.
19. **Sack J., Amado O., Lunenfeld H.** — J. clin. Endocr., 1977, *45*, 171.
20. **Hollander C. S.** — Trans. Ass. Amer. Physicians, 1968, *81*, 76.
21. **Nauman J. A., Nauman A., Werner S. C.** — J. clin. Invest., 1967, *46*, 1 346.
22. **Sterling K., Bellabarba D., Newman E. S., Brenner M. A.** — J. clin. Invest., 1969, *48*, 1 150.
23. **Brown B. L., Ekins R. P., Ellis S. M., Reith W. S.** — Nature (Lond.), 1970, *226*, 359.
24. **Charib H., Ryan R. J., Mayberry W. E., Hockert T.** — J. clin. Endocr., 1971, *33*, 509.
25. **Meinhold H., Wenzel K. W.** — În: „IAEA Symp. on Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 2, p. 127.
26. **Landon J.** — „Supra Regional Assay Service", 1976, 1, p. 37.
27. **Surks M. I., Oppenheimer J. M.** — J. clin. Endocr., 1971, *33*, 612.
28. **Burman K. D., Dimond R. C., Wright F. D., Earl J. M., Bruton J., Wartofsky L.** — J. clin. Endocr., 1977, *44*, 660.
29. **Sterling K., Milch P. O.** — J. clin. Endocrin., 1974, *38*, 866.
30. **Nelson J. C., Weiss R. M., Lewis J. E., Wilcox R. B., Palmer F. J.** — J. clin. Invest., 1974, *55*, 416.
31. **Nelson J. C., Weiss R. M., Palmer F. J., Lewis J. E., Bruce Wilcox R.** — J. clin. Endocr., 1975, *41*, 1 118.
32. **Robbins J., Rall J. E.** — Physiol. Rev., 1960, *40*, 415.
33. **Robbins J.** — În: „The Thyroid and Biogenic Amines" (editat de J. E. Rall și I. J. Kopin), North-Holland Publishing Co., Amsterdam-Londra, 1972, p. 82.
34. **Derrien Y., Michel R., Roche J.** — Biochim. biophys. Acta (Amst.), 1948, 2, 454.
35. **Derrien Y., Michel R., Pedersen K. O., Roche J.** — Biochim. biophys. Acta (Amst.), 1949, *3*, 436.
36. **Mouriz J., Stanbury J. B.** — Canad. J. Biochem., 1968, *46*, 51.
37. **Miescher P., Gorstein F., Benacerraf B., Gell P. G. H.** — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1961, *107*, 12.
38. **Cheng H. F., Peterson R. E., Evans T. C.** — Biochim. biophys. Acta (Amst.), 1968, *168*, 161.
39. **Doniach D., Roitt I. M.** — J. clin. Endocr., 1957, *17*, 1 293.
40. **Cheftel Cl., Bouchilloux S., Lissitzky S.** — C. R. Acad. Sci. (Paris), 1964, *259*, 1 458.
41. **Spiro R. G.** — J. Biol. Chem., 1965, *240*, 1 603.
42. **Edelhoch H.** — Recent. Progr. Hormone Res., 1965, *21*, 1.
43. **Jakoby W. B., Laban L., Edelhoch H., Pastan J., Rall J. E.** — Science, 1966, *153*, 1 671.
44. **Valenta L., Roques M., Torresani J., Rolland M., Lissitzky S.** — Biochim. biophys. Acta (Amst.), 1968, *168*, 507.
45. **De Nayer F., De Visscher M.** — Biochim. biophys. Res. Commun., 1969, *36*, 639.
46. **Assem E. S. K.** — Lancet, 1964, *1*, 139.
47. **Van Herle A. J., Uller R. P.** — J. clin. Invest., 1975, *56*, 272.
48. **Gembicki M., Kosowicz J., Murawska A.** — Verlag Hegermann, Viena, 1976, vol. 12, p. 329—337.
49. **Ochia J., Hachiya T., Yoshimura M. și colab.** — Endocr. Jap. 1975, *22*, 351.
50. **Hageman J., Schneider C.** — În: IAEA Symposium on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31. X.—4. XI. 1977.
51. **Riesco G., Bernal J., Sanchez-Franco F.** — J. Clin. Endocrinol. Metab., 1974, *38*, 33.
52. **Simionescu L., și colab.** — Rev. Roum. Med. Endocrinol., 1977, *15*, 243.
53. **Ikakubo K.** — Folia Endocrinol. Jap., 1975, *51*, 825.
54. **Herle A. J. Van., Chopra I. J., Hershman J. M., Hornabrook R. W.** — J. clin. Endocr., 1976, *43*, 512.
55. **Simionescu Ligia** — Rev. Roum. Med. Endocrinol., 1981, *19*, *4*, 265.

Scanned with OKEN Scanner

5

HORMONII PANCREASULUI

Insulele Langerhans, care alcătuiesc pancreasul endocrin, sintetizează şi eliberează doi hormoni importanţi, insulina şi glucagonul.

Descoperirile în domeniul hormonilor pancreatici constituie momente hotărîtoare în istoria endocrinologiei. În 1889 von Mering şi Minkowski (1) arată că extirparea pancreasului determină apariţia diabetului zaharat.

În 1921 Paulescu (2) şi în 1922 Banting şi Best (3) demonstrează că extractele de pancreas amendează simptomele pancreatectomiei.

La scurt timp după ce preparatele de insulină sînt folosite în experienţe de laborator şi în clinica umană, se descoperă că efectul hipoglicemiant este precedat adeseori de o hiperglicemie tranzitorie (fig. II.5.1.). În 1923, Kimball şi Murlin (4) separă factorul pancreatic hiperglicemiant şi îl numesc glucagon.

5.1. INSULINA

5.1.1. INTRODUCERE

A. *Locul de sinteză*

Insulina este secretată de celulele B ale insulelor Langerhans. Aceste celule sînt cele mai numeroase dintre celulele de tip insular şi se deosebesc prin prezenţa în interiorul lor a unor granule solubile în alcool. Celulele B pot fi distruse selectiv prin administrarea aloxanului. Pentru a urmări efectele absenţei insulinei se practică pancreatectomia chirurgicală asociată cu aloxan. Efectele observate sînt următoarele:

— creşterea treptată a glicemiei cu apariţia glicozuriei;

— scăderea glicogenului hepatic;

— scăderea utilizării glucozei manifestată prin scăderea toleranţei la glucoză şi scăderea coeficientului respirator;

Scanned with OKEN Scanner

— creşterea utilizării proteinelor şi a conversiunii aminoacizilor în glucoză (gluconeogeneza); odată cu glicozuria creşte şi excreţia azotului;

— scad depozitele de grăsime şi creşte conţinutul sanguin în lipide; scade conversiunea glucozei la acizi graşi şi creşte utilizarea grăsimilor; în stadii avansate, oxidarea acizilor graşi este incompletă şi de aceea se acumulează acizi graşi nesaturaţi, acid acetoacetic şi acetonă;

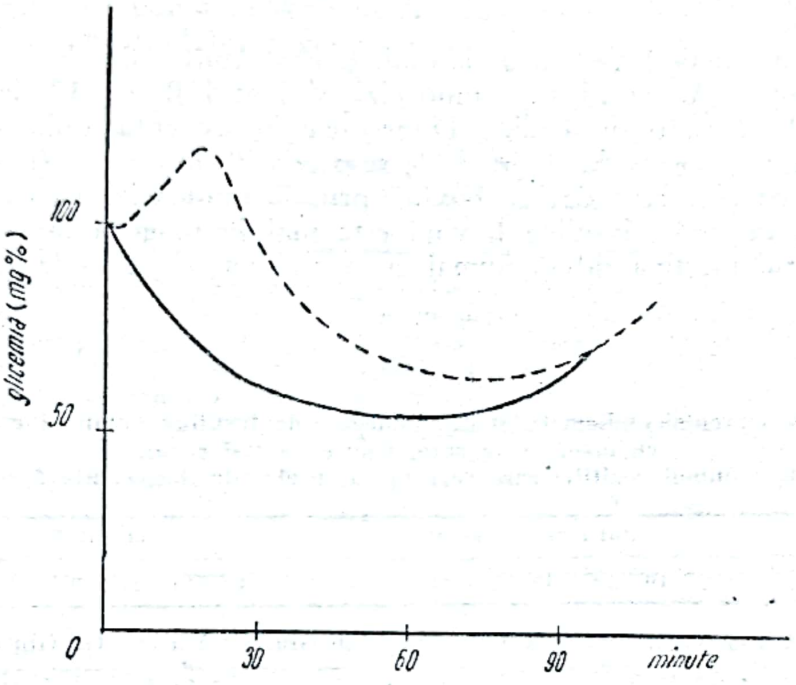


Fig. II.5.1. Efectul preparatului de insulină contaminat cu glucagon (-----) şi al preparatului de insulină fără glucagon (————) asupra concentraţiei glucozei în sînge.

— pierderea glucozei, a azotului şi a acizilor graşi prin urină este asociată cu creşterea cantităţii de apă şi de electroliţi, în special cationi; pierderea electroliţilor bazici duce la acidoză şi moarte.

Administrarea insulinei anulează toate aceste efecte. Simptomele diabetului după pancreatectomie sînt mult ameliorate dacă animalul a fost hipofizectomizat în prealabil. Măsurarea concentraţiei insulinei în ser sau în plasmă permite estimarea cantităţii de insulină în condiţii bazale şi dinamica eliberării din celulele beta pancreatice sub influenţa glucozei şi pune în evidenţă eliberarea bifazică a insulinei. În primele 15 minute apar în circulaţie mici cantităţi furnizate de un mic depozit cu eliberare rapidă printr-un proces de emiocitoză. La 1—2 ore apare al doilea val, mai amplu, rezultat probabil dintr-un compartiment pancreatic care furnizează mai lent, atît insulină preformată, cît şi insulină secretată „de novo" contaminată cu proinsulină. Se admite că primul val este cel eficient.

Celulele beta-insulare alcătuiesc aproximativ 1% din greutatea pancreasului; concentraţia insulinei în insulele Langerhans este de 4 U/g, iar conţinutul total este de 200 U. Rezultă un raport depozit / sînge = 8 000 în condiţii bazale, luînd concentraţia bazală egală cu 10 μU/ml şi masa plasma-

Scanned with OKEN Scanner

tică de 2,5 litri. Rata secreției este de 0,5 U/oră iar semiviața este de 20 de minute.

B. *Natura chimică și relația structură-funcție*

Insulina. Structura chimică a insulinei bovine a fost stabilită în 1955 (5), urmînd apoi insulinele diferitelor specii de vertebrate mamifere, păsări, pești.

Clinicianul și radioimunologul operează practic cu insulină de om, bou, porc și cobai.

Insulina, cu GM de 6 000 daltoni, este alcătuită din două lanțuri polipeptidice: lanțul A, cu 21 de aminoacizi, și lanțul B, cu 30 de aminoacizi, unite prin două punți disulfidice. Diferențele în secvența aminoacizilor între insulinele de om, porc și bou sînt de 1, respectiv 3 aminoacizi (tabelul II.5.1.). Insulina de cobai diferă de cea bovină prin 7 aminoacizi în lanțul A și 10 în lanțul B, de aceea insulina bovină este mai imunogenă la cobai decît la iepure, a cărui insulină diferă numai cu 3 aminoacizi (2 în lanțul A și 1 în lanțul B).

Tabelul II.5.1.

Compararea secvenței aminoacizilor din molecula de insulină umană luată ca etalon cu insulina de porc, iepure, bou și cobai.
Sînt arătate numai pozițiile care variază cu specia (după referința 6 modificat)

Specia	lanțul A								lanțul B										
	4	8	9	10	12	13	14	18	3	4	10	14	17	20	21	22	27	29	30
Om	Glu	Tr	Ser	Ile	Ser	Leu	Tir	Asn	Asn	Glu	His	Ala	Leu	Gli	Glu	Arg	Tr	Lis	Tr
Porc																			Ala
Iepure																			Ser
Bou		Ala		Val															Ala
Cobai	Asp	Ala	Gli	Tr	Tr	Arg	His	Ser	Ser	Arg	Asn	Tr	Ser	Glu	Asp	Asp	Ile		Asp

Exceptînd insulina de cobai, toate insulinele de mamifere au o activitate biologică de aproximativ 24 UI/mg, măsurată prin metoda hipoglicemiei la iepure, prin proba convulsiilor la șoarece și prin tehnica pe epididim la șobolan. Insulina de cobai este de patru ori mai puțin activă în proba convulsiilor la șoarece.

Reducerea uneia din cele două punți disulfidice duce la pierderea completă a activității biologice.

Deși structura primară a diferitelor insuline este foarte asemănătoare, ele pot fi diferențiate imunochimic cu ajutorul antiserurilor specifice.

Insulina porcină conține patru reziduuri tirozinice, două în lanțul A și două în lanțul B.

Proinsulina, precursorul insulinei, este alcătuită din trei lanțuri polipeptidice și anume capul N terminal al lanțului A și capul C terminal al lanțului B sînt conectate prin lanțul C, un peptid cu 33 aminoacizi.

Descoperirea proinsulinei a rezultat din studiul adenomului insular secretor de insulină (7). La probe *in vivo*, proinsulina prezintă numai

Scanned with OKEN Scanner

15—20% din activitatea insulinei. Ea contaminează produsele uzuale de insulină şi reacţionează cu antiserurile folosite în RIA, dar nu reacţionează identic cu serurile antiinsulină purificată.

C. *Funcţiile insulinei* pot fi deduse din efectele pancreatectomiei (tabelul II.5.2.). La omul normal, insulina este principalul semnal umoral prin care ţesuturile sînt informate asupra stării lor de saţietate sau de foame. Intervenţia în ciclurile metabolice ale hidraţilor de carbon, ale proteinelor, lipidelor şi ale electroliţilor a determinat caracterizarea insulinei ca modulator al homeostaziei combustibilului (materialul energogen) în organism intact (8).

Tabelul II.5.2.

Efectele insulinei

Nivelul intervenţiei	Efectul
Metabolismul hidraţilor de carbon	Catabolic: utilizarea glucozei în ţesuturile periferice creşte
Transport prin membrana celulară	aminoacizii cresc K^+ creşte
Metabolismul protidic	Anabolic: sinteza proteinelor creşte proteoliza scade
Metabolismul lipidic	lipolitic: sinteza trigliceridelor creşte lipoliza scade

Reglarea şi controlul sintezei, stocării şi eliberării insulinei constituie obiectul multor cercetări (8, 9, 10, 11, 12, 13). Secreţia insulinei este influenţată de mulţi hormoni. Deşi stimulul principal al secreţiei insulinei este hiperglicemia, injecţia de glucagon sau de hormoni gastrointestinali ca secretina, gastrina şi pancreozimina-colecistokinina determină creşterea promptă a secreţiei de insulină. Dimpotrivă, catecolaminele, chiar după administrarea glucozei, inhibă secreţia insulinei. Concentraţia insulinei în sînge — în condiţii bazale sau după aplicarea unui stimul — se modifică în diferite situaţii fiziologice şi sub influenţa multor substanţe bioactive (14).

Detectarea factorului inhibitor al hormonului somatotrop (somatostatina sau SRIF) în celulele D ale pancreasului în concentraţii cu numai un ordin de mărime mai mici decît în hipotalamus (15, 16) incită la noi interpretări ale mecanismelor de reglare ale secreţiei insulinei în stare normală şi patologică.

5.1.2. METODE BIOLOGICE DE MĂSURARE A INSULINEI

Metode in vivo: metoda *hipoglicemiei la iepure* şi metoda *convulsiilor la şoarece* se bazează pe efectul insulinei de scădere a glicemiei. Aceste metode au fost folosite pentru standardizarea preparatelor de insulină, o „unitate" definindu-se ca cea mai mică cantitate care reduce glicemia la iepure la 45 mg/100 ml în 4 ore de la injecţie. Sensibilitatea tehnicii este de aproximativ 0,04 mg insulină bovină cristalizată. La şoareci, 0,07 mg produc convulsii la 50% din 24 de animale în 1,5 ore după injecţie.

Scanned with OKEN Scanner

Sensibilitatea acestor tehnici biologice a fost sporită prin folosirea şobolanilor cu diabet aloxanic, hipofizectomizaţi sau suprarenalectomizaţi. În acest fel, o mU echivalentă cu 4×10^{-5} mg insulină cristalizată reduce glicemia la 50% din valoarea sa iniţială. Nici cu aceste ameliorări, tehnicile biologice *in vivo* nu pot fi folosite pentru studiul concentraţiei insulinei în lichidele biologice.

Metode in vitro. Sînt cunoscute metoda *diafragmului de şobolan* bazată pe proprietatea insulinei de a creşte captarea glucozei din mediul în care este incubat ţesutul (17). Hemidiafragmul prelevat de la şobolan *à jeun* este spălat şi incubat în mediu cu glucoză 2,5 mg/ml. După 3 ore se determină concentraţia glucozei în mediu. Se poate trasa o curbă doză-răspuns în care logaritmul concentraţiei insulinei este corelat liniar cu rădăcina pătrată a captării glucozei. Sensibilitatea tehnicii este de 0,125 mU echivalentă cu 5×10^{-6} mg insulină / ml (18).

Metoda epididimului de şobolan (19) se bazează pe proprietatea insulinei de a creşte consumul de oxigen *in vitro*. Observîndu-se că şi oxidarea glucozei la CO_2 în ţesutul gras este sensibilă la acţiunea insulinei (20), a fost dezvoltată o tehnică bazată pe incubarea secţiunilor de epididim în mediu cu ^{14}C-1-glucoză, cu determinarea cantităţii convertită în $^{14}CO_2$. În prezenţa insulinei, radioactivitatea recuperată ca CO_2 creşte cu 40—400%, creşterea de 40% reprezentînd răspunsul la o doză de 10 μU (4×10^{-7} mg) de insulină. Curba log doză-răspuns este liniară în limitele de 3—500 μU ($1{,}2—20\times10^{-6}$ mg). Deşi sensibilitatea aceasta tehnici este foarte apropiată de cea a metodei RIA, totuşi ea este laborioasă şi greu reproductibilă.

5.1.3. METODA RIA PENTRU CANTIFICAREA INSULINEI

Cu metoda de dozare a insulinei Yalow şi Berson (21) deschid noile căi ale radioimunoanalizei şi metodelor similare. Sistemele RIA uzuale sînt sisteme mixte, în care preparatul standard este insulină umană, trasorul este porcin, iar antiserul este obţinut prin imunizare cu insulină porcină.

A. *Imunogenul.* Majoritatea preparatelor de insulină folosite ca imunogene pînă în ultimii ani sînt insuline care conţin şi proinsulină. S-a observat că preparatele brute de insulină sînt mai bune imunogene decît cele purificate; prezenţa unor componente cu greutate moleculară mai mare care cocristalizează cu insulina pot stimula formarea anticorpilor (22, 23, 24). Sînt folosite insuline porcine comerciale destinate terapiei ca: insulina cristalizată, lentă, zinc insulina. Recent, este folosită insulina porcină fără proinsulină.

B. *Antiserul.* Specia preferată pentru imunizare este cobaiul. S-a observat că antiserurile obţinute la iepuri au afinitate slabă pentru insulina umană. Doza de insulină este limitată deoarece poate produce hipoglicemie brutală şi moartea animalului; de aceea se folosesc emulsii foarte vîscoase în adjuvant Freund (25, 26). Pentru insulina uzuală, în injecţii subcutanate, doza este de 0,5 mg per injecţie. De exemplu 5 mg insulină porcină se dizolvă în 7 ml fenol 0,3% (greutate/volum) acidifiat la pH=2,3 cu acid acetic diluat şi 3 ml de vaccin *H. pertussis*. Se face o emulsie vîscoasă cu 10 ml adjuvant şi se injectează subcutanat cîte 2 ml per animal (27).

Insulina „componentă unică" (fără proinsulină) în doze de 150 μg, dizolvată în 250 μl apă, este emulsionată cu un volum egal de adjuvant şi injec-

Scanned with OKEN Scanner

tată intradermic în multiple locuri (28). După 3—4 rapeluri, la început lunare apoi la 3 luni, se obţin antiseruri cu titru satisfăcătoare, cu legare de 50% a trasorului la o diluţie iniţială de 1 : 1 000—1 : 5 000 în funcţie de antiser.

Insulina umană nu dă antiseruri mai bune decît cea porcină avînd dezavantajul că ar putea fi contaminată cu alte proteine umane.

Pentru dozarea proinsulinei şi a peptidului-C la om, sînt preferate serurile anti-proinsulină umană şi peptid-C uman, deoarece există diferenţe structurale mari faţă de omologul lor bovin sau porcin (28).

C. *Insulina marcată.* Se foloseşte insulină porcină „componentă" unică 1,0 mg/ml în HCl 0,1 N. Radioiodurarea cu ^{125}INa se face prin metoda cu cloramina-T, obţinîndu-se activităţi specifice de aproximativ 150—300 μCi/μg. Purificarea insulinei marcate se face pe coloană cu pulbere de celuloză (Whatman, standard grade) sau pe coloană de gel de dextran tip Sephadex G—50 fin. Verificarea purităţii se face prin metodele uzuale de precipitare cu TCA, radiocromatografie şi imunoreactivitate în exces de anticorp.

D. *Standardul.* Se folosesc preparate de insulină umană de exemplu insulină monocomponentă cu activitate biologică de 25,7 UI/mg (Novo Terapeutisk, Danemarca). Rezultatele diferitelor laboratoare pot fi comparate folosind al 4-lea standard internaţional O.M.S. în care 1 UI de insulină corespunde cu 0,04167 mg de insulină porcină şi bovină în părţi egale.

Insulina standard este conservată la —20°C la întuneric, şi se evită îngheţul şi dezgheţul repetat.

E. *Probele biologice*

Insulina este măsurată în probele biologice ca atare, fără vreo pregătire specială. Insulina rămîne stabilă în *sîngele* total menţinut la temperatura camerei cîteva ore. Dozarea se face în ser sau în plasmă. În ser apare uneori hemoliza care poate da valori fals reduse ale insulinei. Plasma nu trebuie să conţină concentraţii de heparină mai mari de 20 UI/ml, deoarece heparina este un polianionit puternic care poate inhiba reacţia antigen-anticorp (29). Se preferă adesea EDTA în concentraţii de 1,5 mg/ml de sînge total (28).

Pentru dozarea insulinei în urină, se adaugă albumină pentru o concentraţie finală de 0,2—0,5 g%.

Dacă se urmăreşte diferenţierea insulinei de proinsulină, atunci plasma este supusă în prealabil unui procedeu de separare (30) sau se recurge la un sistem specific pentru proinsulină sau pentru peptidul-C (31).

F. *Incubarea reactivilor şi tehnica de separare*

Incubarea se face la 4°C pentru intervale de timp alese în funcţie de sistemul folosit. Se poate folosi orice tehnică de separare adecvată sistemului RIA şi condiţiilor existente în laborator.

G. *Performanţele sistemului RIA*

Sensibilitatea majorităţii sistemelor RIA este de 0,1 ng=2,5 μU.

Specificitatea: în afara proinsulinei, alte proteine serice nu interferează în sistem.

Precizia: variabilitatea intra- şi interserii este de 5 şi respectiv 8—10%.

Preparatul de insulină umană standard internaţional O.M.S. (I—IRP—1974) poate fi obţinut de la National Institute for Biological Standard and Control, *Holly Hill*, Hampstead, Londra, NW 3,6 RB Anglia. Activitatea preparatului a fost determinată prin biodozare prin comparaţie cu al 4-lea

Scanned with OKEN Scanner

standard internațional pentru insulină bovină și porcină pentru biodozare. Pe baza rezultatelor, o unitate de insulină umană pentru imunodozare este definită ca activitatea conținută în 1,8233 mg din preparatul internațional de referință (I—IRP).

5.1.4. APLICAȚII CLINICE ȘI REZULTATE

A. *Considerații generale*

Clasificarea situațiilor clinice în care poate fi implicată insulina, folosind criteriul concentrației sanguine a glucozei distinge stări hiper- și hipoglicemice.

Hipoinsulinismul este însoțit de hiperglicemie dar hiperinsulinismul poate fi însoțit de normo- sau hipoglicemie.

În stările *hiperglicemice* se consideră că măsurarea insulinei imunoreactive (IRI) prezintă interes mai mult pentru studii de fiziopatologie. Dozarea IRI este folosită totuși pentru diagnosticul diferențial al diabetului juvenil și al celui cu debut la maturitate (32), nu și pentru diagnosticul diferențial al altor tulburări însoțite de hiperglicemie cu intoleranță la glucoză.

Hipoinsulinemia, relativă sau absolută, însoțește diabetul dar numai diabetul juvenil este caracterizat printr-o scădere absolută sau prin absența completă a insulinei.

În diabetul cu debut la maturitate, răspunsul maxim al insulinei la încărcarea cu glucoză este întîrziat și poate fi mai amplu decît la normali. Totuși, deoarece nivelul corespunzător al glucozei ar necesita un răspuns al insulinei mai mare decît la normali, rezultă un deficit relativ de insulină. Determinarea insulinei plasmatice este rareori indicată pentru diagnosticul sau urmărirea terapiei diabetului. Diabeticii tratați cu insulină produc aproape invariabil anticorpi care interferează cu dozarea insulinei prin RIA. Se folosesc procedee speciale de extracție pentru a putea face o estimare a insulinei circulante și a capacității de legare a anticorpilor la bolnavi cu rezistență gravă la insulină (33).

Hiperinsulinismul fără hipoglicemie se observă în obezitate, în al treilea trimestru al sarcinii, în sindromul Cushing, acromegalie, tirotoxicoză, distrofia miotonică și în hipokaliemie.

Hiperinsulinismul cu hipoglicemie se observă numai la pacienți cu insulinom benign sau malign sau la cei care au primit (deliberat sau din greșeală) o doză mare de insulină. Acestea sînt unicele situații patologice în care dozarea IRI este esențială pentru diagnostic. Insulinomul este caracterizat prin secreția episodică sau continuă a unor cantități inadecvate de insulină față de nivelul glicemiei. În alte situații, inclusiv obezitatea, hipoglicemia determină o supresie semnificativă și reproductibilă a secreției insulinei (34).

Secreția inadecvată de insulină la pacienții cu tumori beta-insulare are trei caracteristici enumerate în ordinea importanței lor:

— incapacitatea de a reveni la normal sau de a scădea sub valorile normale *à jeun*, prin foame sau hipoglicemie;

— răspuns exagerat la secretagoge de tip tolbutamidă, glucagon și leucină;

— alterarea răspunsului la ingestia glucozei.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru diagnosticul de insulinom, medicul recurge la o succesiune de strategii:

a) Cînd pacientul este suspectat de hipoglicemie, determină glicemia *à jeun* şi dacă este 40 mg/100 ml sau mai mică, există indicii de hipoglicemie (valoarea indicator „40" este apreciată şi funcţie de tehnica de cantificare a glucozei). Dar adesea aceste valori sînt în limite normale.

b) Se determină glicemia şi insulinemia în *criza de hipoglicemie.* Tehnica de determinare a IRI trebuie să fie suficient de sensibilă pentru a detecta modificările concentraţiilor mici de insulină. La normali, hipoglicemia diminuează secreţia de insulină pînă la niveluri abia detectabile (28). În tumorile beta-insulare nivelul IRI rămîne practic nemodificat. S-a propus un calcul al *raportului corectat* insulină / glucoză (35) sub forma:

$$\frac{\text{IRI}}{\text{G-30}} = \frac{\text{insulinemia } (\mu\text{U/ml}) \times 100}{\text{glicemia (mg/100 ml)} - 30}$$

La normali, raportul corectat este sub 30 μU/mg. La obezi, deşi nivelul insulinemiei poate fi crescut, raportul corectat este sub 50 μU/mg, deoarece în timpul probei la foame, ei au şi valori crescute ale glicemiei de peste 75 mg/100 ml, de aceea riscul de confuzie cu insulinomul este redus. În insulinoame verificate chirurgical, valoarea raportului este de peste 200 μU/mg (35). Uneori, valoarea raportului corectat variază în limite largi de la o zi la alta (35).

c) Se urmăreşte dacă hipoglicemia apare la foame sau la unul din stimulii specifici (cantitate mare de hidraţi de carbon în alimentaţie, fructoză, alcool etc.). Dacă hipoglicemia apare la foame, atunci există alternativa: tumoare beta-insulară sau alte situaţii patologice nedatorite insulinei endogene. Se recurge la probe dinamice.

d) *Proba de încărcare orală cu glucoză* (OGTT=oral glucose tolerance test) cu măsurarea glicemiei cu sau fără insulinemie. Curba poate fi normală sau alterată. În nici unul din cazuri nu are valoare.

e) *Inducerea deliberată a hipoglicemiei*

— După OGTT se recurge la *proba la foame.* Dacă după 72 de ore de post (36) glicemia nu scade la 40 mg/100 ml diagnosticul de tumoare beta-insulară sau de orice stare hipoglicemică *à jeun* este exclus. Proba întreruptă înainte de 72 de ore fără apariţia hipoglicemiei nu are nici o valoare.

Dacă pacientul este supus unui *post total de 16 ore,* diagnosticul de insulinom poate fi precizat în 80% din cazuri (34). Dacă repetăm proba, pot fi detectaţi pacienţii cu secreţie episodică de insulină.

În stări patologice cu hipoglicemie *à jeun,* postul provoacă hipoglicemie în mai puţin de 72 de ore. Scăderea glicemiei este progresivă şi apare înainte de 24 de ore. Un aspect tipic este absenţa simptomelor de hiperadrenalinemie. Hormonii contrainsulari ca STH — care obişnuit creşte în mod caracteristic în hipoglicemia acută prin insulină endogenă — poate să nu crească o dată cu scăderea progresivă a glicemiei, ceea ce ar putea orienta greşit diagnosticul spre insuficienţa hipofizară.

Dacă insulina este în limite normale (5—30 μU/ml) sau dacă este crescută cînd glicemia este la 40 mg/100 ml, diagnosticul de tumoare a celulelor insulare devine probabil. Dar dacă insulina este absentă în plasmă, nu se exclude diagnosticul de insulinom şi atunci se repetă proba de mai multe ori pînă cînd se găseşte o probă care are insulină. În acest caz, o singură

Scanned with OKEN Scanner

probă cu glicemia de 40 mg/100 ml cu insulină prezentă, pune diagnosticul de insulinom.

Semnificaţia prezenţei insulinei este cu atît mai mare cu cît ne apropiem de sfîrşitul probei. Dacă proba la foame este practicată după OGTT, o valoare crescută a insulinei în primele 6 ore nu are nici o semnificaţie, deoarece poate fi rezultatul unei hiperinsulinemii întîrziate mai ales la persoane cu intoleranţă la glucoză.

O variantă a probei la *foame* este postul de 36 de ore cu administrare de *alcool* la sfîrşitul probei (37).

— Proba la *insulină imunochimic diferită* de cea umană ca insulina de *peşte*, care nu interferează în sistemul RIA (34), este folosită în prezent ca o modalitate sigură de inducere a hipoglicemiei (28).

— Proba la *insulină* uzuală (bovină sau porcină) urmată de RIA specifică pentru peptidul-C endogen este o altă modalitate de a obţine hipoglicemie sigură (28, 38).

f) *Proba la substanţe secretagoge*

În ordinea potenţei, tolbutamida, glucagonul şi leucina sînt folosite ca stimulatori ai insulinei şi au fost mult timp aplicate în diagnosticul insulinomului. În testele la tolbutamidă şi la leucină, un răspuns anormal constă din scăderea exagerată şi prelungită a glucozei şi toate trei produc eliberarea excesivă şi rapidă a insulinei (39, 40). Spre deosebire de celulele insulare normale, celulele tumorale răspund mai viguros la aceste secretagoge decît la glucoză. Dar apar şi rezultate fals negative şi fals pozitive şi deoarece pot apărea uneori hipoglicemii grave, proba la aceste substanţe este rareori indicată (28).

Interpretare: un rezultat negativ, adică răspunsul insulinei este absent, nu are valoare diagnostică. Aproximativ 50% din bolnavii cu insulinom dau rezultate pozitive, cu eliberare exagerată de insulină la substanţele secretagoge menţionate. Răspunsul la fiecare din substanţe pare să fie independent de răspunsul la celelalte (41).

Chiar cînd diagnosticul a fost stabilit, se face proba la fiecare din secretagoge pentru a stabili care este substanţa la care se obţine răspuns pozitiv şi aceasta va fi folosită pentru urmărirea postoperatorie a bolnavului şi pentru stabilirea eficienţei terapeutice.

Mai simplu de interpretat este *proba la leucină*, care pare să fie mai sigură. La normali, insulina creşte foarte puţin, iar glicemia scade foarte puţin, orice modificare semnificativă a unuia din aceşti doi parametri este datorită foarte probabil unei tumori insulare. Uneori piscul maxim al IRI poate apărea la 5—10 minute după ingestia leucinei.

La adulţi, creşterea insulinei plasmatice, cu sau fără scăderea glicemiei, sugerează puternic diagnosticul de tumoare insulară, pe cînd scăderea glicemiei fără creşterea insulinemiei reprezintă un rezultat ambiguu, care necesită repetarea probei.

Proba la leucină poate fi pozitivă şi la adulţi trataţi cu sulfoniluree sau la copii cu hipoglicemie spontană idiopatică forma leucinosensibilă.

Glucagonul determină creşterea insulinemiei la normali *şi* direct *şi* prin creşterea glicemiei. În unele tumori beta-insulare are loc eliberarea exagerată a insulinei sub acest stimul.

Tolbutamida, la normali, determină creşterea secreţiei insulinei, însoţită de scăderea promptă a glicemiei. În tumorile beta-insulare se observă

Scanned with OKEN Scanner

răspunsul exagerat al insulinei cu sau fără scăderea exagerată a glicemiei. Rezultatul negativ nu are nici o valoare diagnostică.

Uneori proba pretează la confuzii, ca în cazul sindroamelor hipoglicemice (fără tumoare) cînd apar hipoglicemii prelungite fără răspuns exagerat al insulinei. În obezitate sau în distrofia miotonică, răspunsul insulinei la tolbutamidă poate fi exagerat, mai ales dacă proba este aplicată după OGTT.

g) *Proba terapeutică la diazoxid*

Antihipertensiv nediuretic, diazoxidul este o tiazidă, care împiedică eliberarea insulinei şi, ca urmare, dă hiperglicemie.

Bolnavii cu tumoare beta-insulară se ameliorează vizibil după diazoxid, pe cînd cei cu alte tumori care dau hipoglicemie prin alte mecanisme decît secreţia insulinei, nu răspund. De remarcat că numai tumorile insulare secretă insulină; nu s-a semnalat existenţa unei secreţii ectopice de insulină.

Proba se aplică atunci cînd rezultatul altor probe este echivoc. Proba negativă nu are valoare diagnostică, deoarece nu toate tumorile răspund la diazoxid.

h) *Proba la efort*

La normali, în timpul efortului, insulinemia nu se modifică sau scade foarte puţin, dar creşte în stările hipoglicemice cu secreţie moderată de insulină (42).

B. *Tehnica probelor dinamice*

Ori de cîte ori se măsoară insulina, se determină simultan şi glicemia; semnificaţia nivelului insulinei se asigură numai pe baza concentraţiei glucozei sanguine. Cînd se completează buletinul de cerere a insulinemiei, se adaugă şi valoarea glicemiei în proba trimisă laboratorului.

Pregătirea probelor de sînge. Pentru fiecare probă se recoltează 4—6 ml sînge. Separarea serului se face după retracţia cheagului, timp în care probele rămîn la temperatura ambiantă (1—3 ore). Conservarea se face la —20°C, iar transportul pe distanţe lungi se face tot în stare congelată. Conservarea la +4°C sau la temperatura camerei pe intervale de peste 12, respectiv 6 ore poate duce la degradarea insulinei.

Buletinul de însoţire al probelor conţine: numele, vîrsta şi sexul bolnavului, diagnosticul de prezumţie, date asupra glicemiei, medicaţia, schema detaliată a probei dinamice. Probele de sînge sînt codificate corect.

Pregătirea bolnavului. Din pricina efectelor variabile ale hormonilor intestinali asupra nivelului insulinei plasmatice, sîngele este recoltat pe nemîncate, cu excepţia crizelor de hipoglicemie „spontană". Pregătirea bolnavului şi precauţiile sînt diferite în funcţie de proba dinamică indicată. De cele mai multe ori sînt necesare prelevări multiple, de aceea este de preferat ca acul să rămînă în venă tot timpul probei.

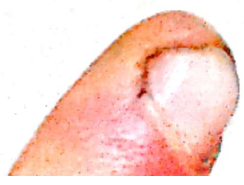
a) *OGTT* este o probă clasică şi cea mai bună pentru a descoperi intoleranţa la glucoză, prin simpla dozare a glucozei în sînge.

Desfăşurarea probei:

— 3 zile dietă cu cel puţin 300 g hidraţi de carbon pe zi;

— a 4-a zi se inseră acul în venă şi se recoltează sînge după cîteva minute;

— se administrează 100 g glucoză în 200 ml apă (1,75 g/kilocorp greutate ideală sau 50 g/m² suprafaţă corporală, doza maximă este de 100 g), care este ingerată în 4—5 minute. Se iau prize de sînge la 7, 15, 30, 60, 120, 180, 240 de minute după ingestia glucozei. Proba se întrerupe la 4 ore, în



Scanned with OKEN Scanner

cazul bolnavilor cu suspiciune de sindrom hiperglicemic, şi se continuă pînă la 6 ore la cei cu suspiciune de sindrom hipoglicemic.

b) *Proba la foame* este indicată la bolnavii cu suspiciune de sindrom hipoglicemic. *Precauţii:* proba se efectuează numai în mediu de spital; pentru a evita apariţia şi consecinţele crizei de hipoglicemie gravă, se măsoară glicemia frecvent şi se anunţă prompt medicul; se controlează reflexele tendinoase şi se semnalează cînd apare hiperreflectivitate sau pierderea capacităţii de a face calcule aritmetice simple. *Măsuri:* se păstrează acul în venă, de exemplu prin perfuzie lentă cu ser fiziologic ceea ce permite prize frecvente pentru dozarea glicemiei şi pentru intervenţia cu glucoză în caz de hipoglicemie. Tot timpul probei bolnavul ingeră numai apă, ceai sau cafea fără zahăr. Probele de sînge se recoltează la fiecare 6 sau 12 ore pentru determinarea glicemiei şi a insulinemiei. Proba se întrerupe în cazul apariţiei crizei hipoglicemice, *nu* înainte de a recolta sînge pentru determinarea glicemiei şi a insulinemiei.

c) *Proba la leucină* (43, 44). Dimineaţa pe nemîncate (10—12 ore post peste noapte), bolnavul ingeră L-leucină, 150 mg/kilocorp dintr-o soluţie de 20 g/l. Deoarece leucina este puţin solubilă, soluţia se prepară pe o baie cu apă fiartă adăugînd şi cîteva picături de zeamă de lămîie. Dacă bolnavul nu suportă gustul neplăcut, se administrează prin sondă.

Probele de sînge pentru glicemie şi IRI se recoltează *à jeun* şi la 5, 10, 15, 30, 60 de minute după încărcarea cu leucină.

d) *Proba la glucagon.* Dimineaţa pe nemîncate, după prelevarea probei de sînge pentru glicemie şi IRI, se administrează i.v. *lent* 1 mg glucagon. Prizele de sînge se culeg la aceleaşi intervale ca la OGTT.

e) *Proba la tolbutamidă* (varianta scurtă): dimineaţa pe nemîncate se administrează i.v. *lent* 1 g de tolbutamidă sodică şi se recoltează sînge înainte şi la 5, 10, 15, 30 de minute după injecţie.

f) *Proba la efort.* În funcţie de starea clinică a bolnavului, se aplică proba la efort *moderat* de 450 Kgm / minut, timp de 40 de minute sau proba la efort *greu* de 900 Kgm / minut, timp de 20 de minute. Proba se efectuează la bicicleta ergometrică şi se prelevează sînge înainte şi la terminarea probei.

C. *Determinarea anticorpilor antiinsulină* este indicată în rezistenţa la insulina exogenă care apare la unii bolnavi cu diabet zaharat trataţi cu insulină heterologă. Tehnica este similară cu titrarea serului antihormoni (partea generală) şi rezultatul se exprimă ca ultima diluţie a serului de la pacient care dă legare semnificativă a ^{125}I-insulinei (69). Este una din utilizările coprodusilor sistemelor RIA. La peste 90% din bolnavii trataţi mai mult de două luni cu insulină bovină — în special formele cu resorbţie lentă — se pot pune în evidenţă anticorpi antiinsulină.

D. *Măsurarea IRI în urină* are unele indicaţii la diabeticii cu anticorpi antiinsulină, la care valoarea reală a insulinei plasmatice este alterată. În urină apare insulina nelegată de anticorp.

E. *Rezultate*

Adulţi normali în condiţii bazale. Nivelul insulinei dimineaţa pe nemîncate este de 2—30 μU/ml. La obezi, valorile sînt duble.

Adulţi normali în cursul OGTT. Nivelul insulinei creşte la 50—120 μU/ml. Pe măsură ce glicemia scade, apare o scădere semnificativă

Scanned with OKEN Scanner

și reproductibilă a insulinemiei ca efect al supresiei prin hipoglicemie (fig. II.5.2.). La obezi adulți stimularea cu glucoză determină creșteri ale nivelului insulinei mai ample ca la normoponderali (fig. II.5.3.). În stările hiperglicemice, răspunsul insulinei la încărcarea cu glucoză variază în limite largi; în general lipsește primul val, iar al doilea pisc apare întîrziat (fig. II.5.4.).

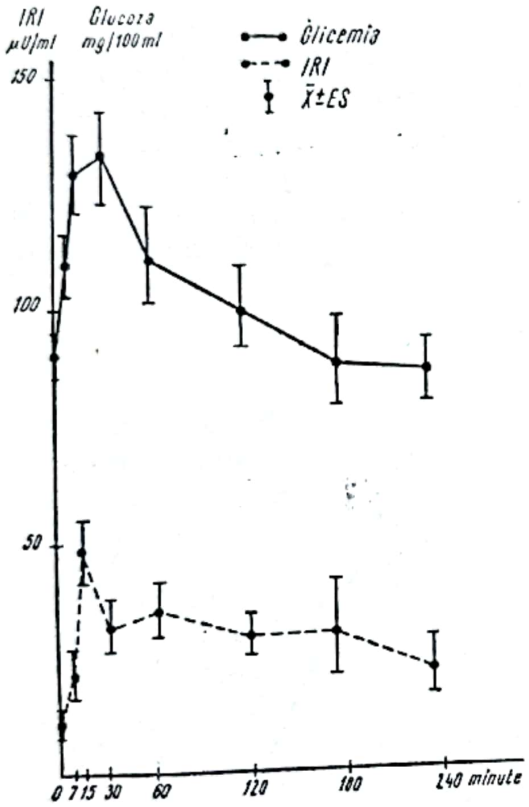


Fig. II.5.2. Valorile glicemiei și ale IRI la 18 adulți sănătoși normoponderali în cursul OGTT cu 100 g glucoză.

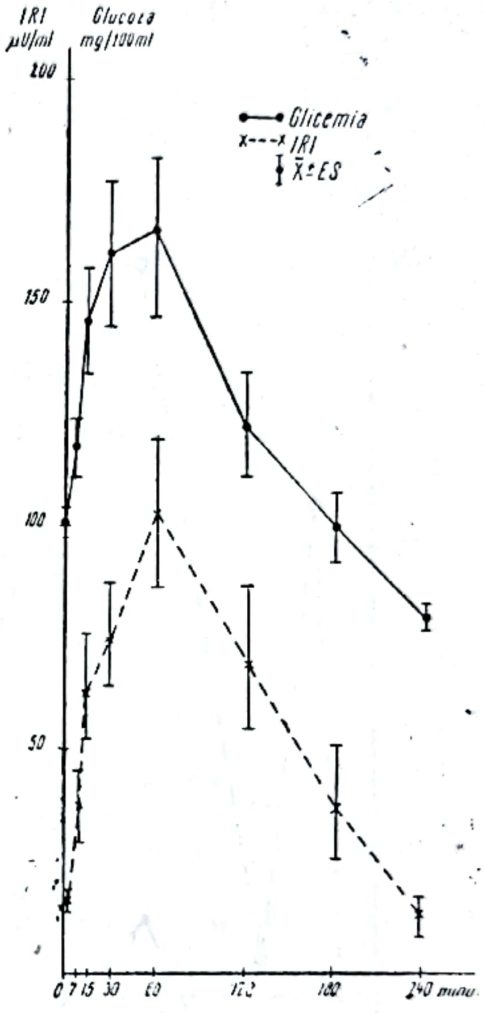


Fig. II.5.3. Valorile glicemiei și ale IRI la 20 obezi adulți în cursul OGTT cu 100 g glucoză.

Proinsulina contribuie cu aproximativ 20% din totalul IRI. Cînd este stimulată eliberarea insulinei, cantitatea absolută de proinsulină crește dar proporția sa față de insulină scade.

Proba la foame. La *adulți sănătoși*, în cursul probei la foame, glicemia scade și anume: procentual la bărbați și cu aproape 100% la femei, pe cînd IRI scade cu 100% față de valoarea bazală la ambele sexe.

Se calculează raportul:

$$\frac{H}{G} = \frac{\text{hormon}}{\text{substrat}} = \frac{\text{IRI } \mu U/ml}{\text{glucoză mg/100 ml}},$$

Scanned with OKEN Scanner

sau raportul

$$\frac{S}{H} = \frac{\text{substrat}}{\text{hormon}} = \frac{\text{glucoză mg/100 ml}}{\text{IRI } \mu U/\text{ml}}.$$

Raportul $\frac{H}{S}$ scade la normali de exemplu de la 0,15 la 0,07 (45) sau raportul $\frac{S}{G}$ creşte de la 7 la 14.

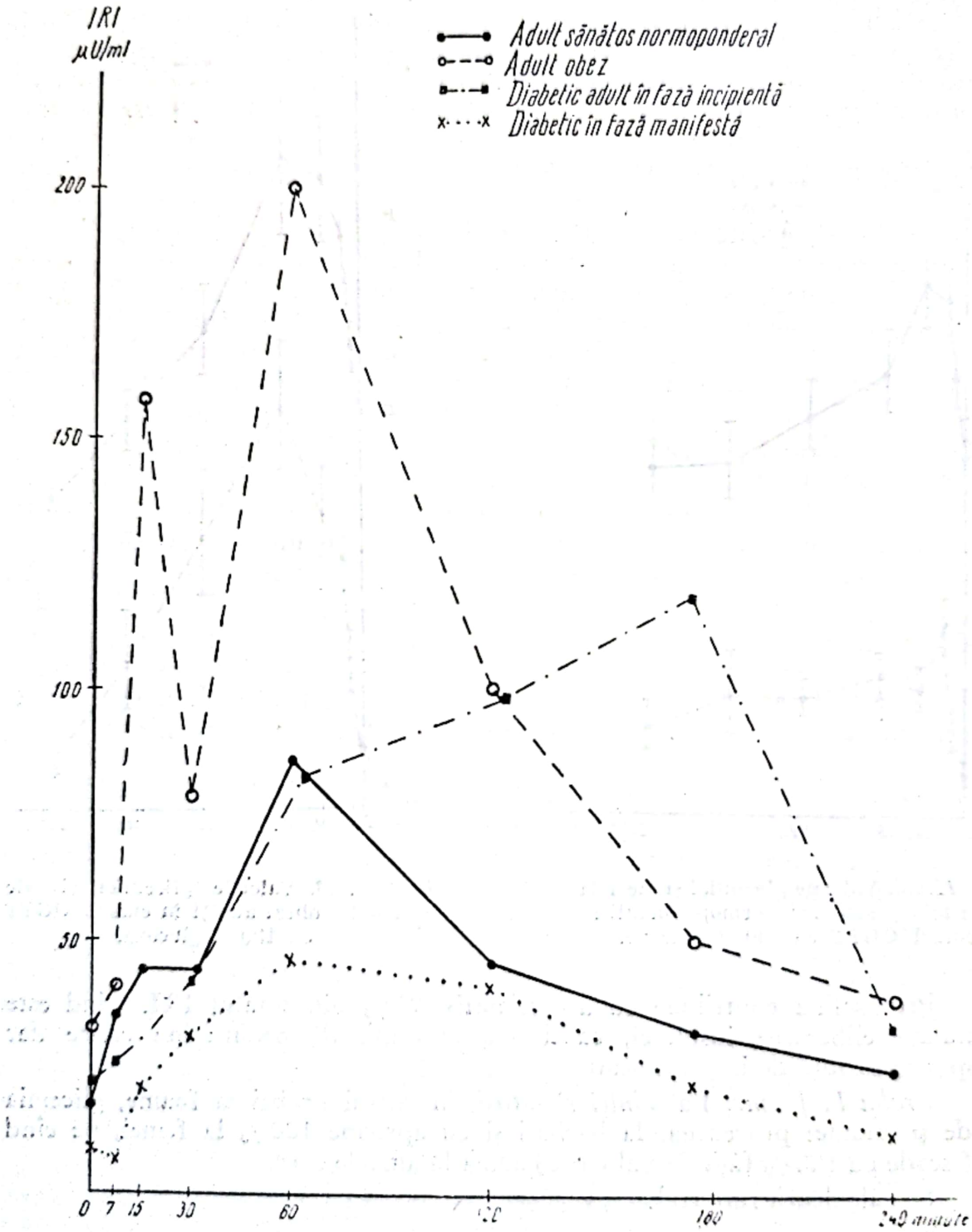


Fig. II.5.4. Curba tipică a valorilor IRI în cursul probei de încărcare orală cu 100 g glucoză.

Scanned with OKEN Scanner

La bolnavii cu insulinom supuși probei la foame, raportul $\frac{H}{S}$, în loc să scadă, crește față de $\frac{H}{S}$ în condiții bazale, cînd acest raport este în limite normale (45). Invers, raportul $\frac{S}{H}$ scade, iar dacă într-o singură probă acesta este mai mic de 2, atunci diagnosticul devine o certitudine.

5.2. PROINSULINA

În majoritatea cazurilor, proinsulina circulantă este prezentă în cantități relativ mici și nu influențează în mod apreciabil valorile absolute ale IRI.

Totuși, uneori, proinsulina poate reprezenta componenta majoră a insulinei din circulație și deoarece ea reacționează mai slab cu anticorpii antiinsulină, valoarea sa reală ar putea fi subapreciată. De aceea se recurge la un procedeu indirect de estimare a concentrației proinsulinei, folosind separarea pe coloane și redozarea fracțiunilor de proinsulină și de insulină față de preparate standard corespunzătoare. Procedeul are multe dezavantaje și este numai orientativ (27).

5.3. RIA PENTRU PEPTIDUL-C

Prin scindarea proinsulinei în granulele secretorii ale celulelor beta se produc cantități echimoleculare de insulină și de peptid-C (46). Peptidul-C nu este degradat în celulele beta și este secretat în circulație împreună cu insulina (47).

Cum peptidul-C nu reacționează încrucișat cu serul antiinsulină, a fost dezvoltat un sistem RIA specific pentru peptidul-C uman (30). Diferențele mari în structura peptidului-C de la diferite specii nu permit folosirea sistemelor heterologe.

Peptidul-C este obținut prin extracție din pancreasul uman obținut la autopsie (48). A fost obținut și prin sinteză organică.

A. *Antiserul.* Peptidul-C legat covalent de albumină serică de iepure (27) este injectat la iepuri sau cobai în cantitate echivalentă cu 0,35 mg peptid-C per doză, în adjuvant Freund. După 3—4 inoculizări la intervale de 2—3 săptămîni se poate obține antiser cu un titru convenabil, de exemplu 1 : 1 000 diluție finală (1 : 100 inițială) (27; 30).

B. *Trasorul.* Deoarece peptidul-C nu conține tirozină, el este tirozilat (27, 30) înainte de marcarea cu ^{125}I. Iodurarea se practică în aceleași condiții ca și pentru insulină. Purificarea peptidului-C marcat se face pe coloană de Bio-Gel P—30 sau un alt gel similar echilibrată cu acid acetic 3M.

C. *Procedeul de dozare* este similar cu al insulinei. Sensibilitatea sistemului RIA pentru peptidul-C este de 75 pg/ml (27).

Insulina nu interferează în sistem. Proinsulina reacționează încrucișat cam a 5-a parte din peptidul-C în termeni de masă. Dar proinsulina reprezintă numai 10—20% din concentrația serică a peptidului-C la normali, deci nu intervine decît cu 1% la concentrația peptidului-C imunoreactiv (CPR). De

Scanned with OKEN Scanner

aceea nu este necesar să se aplice procedee de separare sau de extracţie a probelor de sînge pentru diferenţierea proinsulinei de peptidul-C (27).

D. *Rezultate.* CPR corelează cu IRI în serul persoanelor normale şi de aceea este recomandată ca o posibilitate alternativă pentru investigarea funcţiei celulelor beta (49).

Valorile bazale ale CPR la normali sînt de $1,3 \pm 0,3$ ng/ml şi cresc la $4,4 \pm 0,8$ ng/ml după administrarea glucozei (27, 49).

În situaţii în care măsurarea IRI nu este validă ca în cazul diabeticilor trataţi cu insulină sau care au anticorpi antiinsulină, RIA—CPR devine un indicator util al funcţiei celulelor beta (27, 49).

5.4. GLUCAGONUL

5.4.1. INTRODUCERE

A. *Locul de sinteză.* Glucagonul este secretat de celulele alfa sau A ale insulelor Langerhans. Aceste celule sînt caracterizate prin prezenţa unor granule acidofile mari, solubile în apă şi în soluţii alcaline. Identificarea lor s-a făcut prin distrugerea şi a ţesutului acinar şi a celulelor beta-insulare, secreţia glucagonului rămînînd intactă pe cînd distrugerea prin raze X a celulelor alfa a dus la dispariţia glucagonului.

A. *Natura chimică.* Glucagonul pancreatic (PG) este un polipeptid cu GM de 3 485 daltoni, alcătuit din 29 de aminoacizi. A fost izolat în formă pură cristalizată în 1955 (50), iar secvenţa aminoacizilor a fost stabilită în 1957 (51). Sinteza totală a fost realizată în 1967 (52). Produsul de sinteză este cromatografic şi electroforetic identic cu cel natural, dar posedă numai 50% din activitate.

Glucagonul uman are aceeaşi secvenţă de aminoacizi ca şi cel bovin şi porcin (53).

Din diferite zone ale tractului gastrointestinal a fost izolată o substanţă — enteroglucagonul — care posedă multe activităţi biologice şi imunochimice comune cu glucagonul pancreatic.

Studiul *relaţiei structură-funcţie* arată că digestia cu carboxipeptidază distruge activitatea biologică a glucagonului; pierderea activităţii pare să coreleze cu pierderea fenilalaninei din poziţia 22. Digestia triptică distruge rapid activitatea glucagonului; au fost detectate trei poziţii susceptibile la digestia triptică.

C. *Activitate biologică şi reglare.* Efectul imediat al administrării glucagonului este creşterea glicemiei, care la o doză adecvată poate fi dublată în 20—30 de minute (fig. II.5.3.). Creşterea glucozei are loc pe seama transformării glicogenului hepatic, cel muscular rămînînd neinfluenţat. Acţiunea hiperglicemică a glucagonului dispare la animalele hepatectomizate.

Glucagonul stimulează eliberarea rapidă a insulinei. Administrarea prelungită la animale tinere poate duce la sindromul numit „meta-diabet", care aproximează diabetul zaharat. S-ar putea ca acest sindrom să fie rezultatul epuizării şi degenerării celulelor-beta prin suprastimulare (6).

Bilanţul consecinţelor metabolice ale administrării glucagonului sugerează un efect *catabolic:* scade concentraţia aminoacizilor din plasmă, creşte

Scanned with OKEN Scanner

excreția ureei și balanța azotată devine negativă. Hiperglicemia poate fi datorită gluconeogenezei și glicogenolizei.

Nu s-a putut pune în evidență un sindrom cu deficit de glucagon. Ceea ce se poate afirma pînă în prezent este că glucagonul intervine în mecanismele complexe de reglare a metabolismului glucozei.

Ca și catecolaminele, glucagonul mobilizează glucoza pentru a satisface necesitățile țesuturilor periferice, dar spre deosebire de acestea, nu afectează glicogenul muscular. Alte acțiuni ale glucagonului merg în sens invers cu ale insulinei, de exemplu el inhibă sinteza acizilor grași și stimulează producerea corpilor cetonici.

Secreția glucagonului, ca și a insulinei, este reglată de concentrația glucozei și anume, eliberarea sa este stimulată de hipoglicemie. Pancreozimina stimulează secreția glucagonului dar în doze mai mari decît cele care stimulează insulina.

În rezumat, glucagonul pancreatic (PG) circulant este captat de receptorii specifici ai membranei celulare din organele țintă.

În ficat și în țesutul adipos, interacțiunea hormonului cu receptorii săi stimulează activitatea adenilciclazei și declanșează un lanț de reacții enzimatice care duc la glicogenoliză, gluconeogeneză și lipoliză. Aceasta este baza biochimică a rolului fiziologic al PG: mobilizarea elementelor nutritive în timpul starvării, efortului sau altor stări care necesită catabolism accelerat. S-a demonstrat într-adevăr că PG circulant crește în diabetul zaharat grav, în infecții, hemoragii, arsuri și în alte forme de stress inclusiv anxietatea, durerea sau în stări de hiperactivitate a SNV.

Tabelul II.5.3

Efectele farmacologice ale glucagonului

Țesuturi, organe, sisteme	Efectul
Țesut adipos	— crește cAMP: lipoliză
Ficat	— crește cAMP: glicogenoliză gluconeogeneză
Aparat cardiovascular	— cronotrop — inotrop — dilatarea arteriolelor
Aparat digestiv	— scade motilitatea și secreția stomacului, intestinului și pancreasului exocrin — scade apetitul
Aparat renal	— crește excreția renală a ionilor și diureza
Sînge — elemente figurate — constante biochimice	— inhibă agregarea trombocitelor — crește glicemia — scade concentrația aminoacizilor — scade calcemia
Sistem endocrin	— stimulează eliberarea: calcitoninei insulinei hormonului de creștere catecolaminelor

Scanned with OKEN Scanner

Asupra *sistemului cardiovascular*, PG are efecte cronotrope asociate cu dilatarea arteriolelor. Rezultă scăderea rezistenței vasculare, creșterea debitului cardiac și creșterea fluxului sanguin coronarian și periferic. Aceste date rezultă din experimentele farmacologice și nu se știe dacă și în ce măsură glucagonul intervine în reglarea funcțiilor aparatului cardiovascular.

Efectele farmacologice ale glucagonului sînt enumerate în tabelul II.5.3.

5.4.2. METODE BIOLOGICE DE CANTIFICARE

A. *Metodele in vivo* se bazează pe efectul hiperglicemiant al glucagonului. Sînt folosite animale de laborator: șoareci, iepuri, găini, pisici. Metoda de măsurare a efectului hiperglicemiant la pisică (54) este preferată.

Pisici de 2,5—3 kg, *à jeun*, hidratate, sînt anesteziate cu fenobarbital. Se ia o probă de sînge și se injectează glucagon i.v. Se prelevează sînge la intervale de 8 minute în intervalul de 32 de minute după injecție. Dozarea se poate repeta după 45 de minute. Doza de glucagon de 0,1 μ g/kilocorp crește glicemia cu aproximativ 30 mg% ; o doză dublă produce o creștere de 50 mg%.

B. *Metode in vitro*

— În *metoda bazată pe efectul asupra glicogenolizei* pe secțiuni de ficat de iepure se estimează răspunsul la diferite doze de glucagon prin dozarea glucozei sau a fosforului anorganic. Metoda are o sensibilitate de aproximativ 0,5 μg/ml și este economică dar apar erori datorite unor factori glicogenolitici nespecifici. De aceea se recurge la o metodă în doi timpi:

— fosforilaza din secțiunile de ficat este activată cu glucagon;

— țesutul activat este omogenizat și centrifugat, iar fosforilaza din supranatant este incubată cu glucagon proaspăt.

Rezultatul: în comparație cu martorii fără glucagon, 0,2—2,0 μ g de glucagon crește cantitatea de glucoză cu 10—65% (55).

— *Metoda legată de acțiunea glucagonului asupra fosforilazei* este mediată de cAMP, care se formează din ATP cu ajutorul adenilciclazei. Cînd particulele de membrană sînt spălate și incubate cu ^{14}C—ATP în prezența glucagonului, formarea ^{14}C—cAMP este exacerbată. Adenilciclaza din ficatul de șobolan răspunde la doze sub 0,1 μ g/ml de glucagon (56).

5.4.3. SISTEM RIA PENTRU GLUCAGON

Deși sistemul RIA pentru glucagon (57) este publicat imediat după primul sistem RIA, cel pentru insulină (58), totuși sistemele RIA pentru glucagon prezintă încă multe dificultăți. Acestea sînt generate de similitudinea imunochimică cu enteroglucagonul (EG) și de susceptibilitatea glucagonului pancreatic (PG), marcat și nemarcat, la acțiunea enzimelor proteolitice.

RIA glucagonului la om se face cu sistem RIA pentru glucagon porcin deci este un sistem heterolog.

Este de reținut că glucagonul bovin și porcin au structuri identice (59). Structura moleculară a PG este identică la toate speciile de mamifere cu excepția cobaiului.

Această identitate a structurii glucagonului la specii foarte diferite de mamifere este interpretată ca o măsură de conservare a unei structuri care

Scanned with OKEN Scanner

răspunde unor necesităţi structurale specifice pentru o anumită activitate biologică (59). Ca o consecinţă, un sistem RIA omolog pentru o specie de mamifere este utilizabil pentru multe alte specii, folosind acelaşi preparat de referinţă (60).

A. *Imunogenul.* PG este un imunogen slab. În plus, majoritatea preparatelor comerciale de PG porcin sau bovin sînt heterogene, ele conţinînd cantităţi variabile de glucagon „mare", de polimeri şi fragmente de glucagon, insulină şi alte impurităţi. Se foloseşte glucagon cristalizat de bou sau porc. Glucagonul cristalizat conţine şi insulină care poate fi detectată şi măsurată prin RIA.

Se recurge la o varietate de tehnici pentru a spori imunogenitatea glucagonului şi anume absorbţia pe particule inerte, cuplarea cu proteine, cu polilizină sau cu carboximetilceluloză şi cuplarea glucagon-glucagon (61). Ca agenţi de cuplare se folosesc carbodiimida, bisdiazobenzidina, glutaraldehida sau dietilmalonilimida.

S-a observat că cuplarea cu ajutorul glutaraldehidei sau cu dietilmalonilimida nu implică porţiunea C-terminală, adică porţiunea în care PG diferă ca structură de EG. De aceea, se consideră că aceşti agenţi de cuplare pot da, teoretic, un imunogen care să asigure specificitatea PG (60, 62, 63). PG adsorbit pe particule sau conjugat este pregătit prin emulsionare cu adjuvant Freund pentru a fi inoculat la animale.

B. *Antiserul.* Iepuri adulţi New Zealand primesc cîte 1 mg de PG preparat dintr-una din metodele arătate mai sus. Imunizarea se face intradermic, s.c., i.m., după schemele uzuale şi continuă pînă se obţin antiseruri cu titru convenabil. Antiserurile se obţin greu, de aceea se folosesc loturi mari, de 10—80 de animale (60, 63).

Numărul inoculărilor este de 10—30 şi durata imunizării depăşeşte uneori 12 luni.

Se obţin antiseruri cu specificităţi variabile: cele care reacţionează atît cu PG cît şi cu EG sînt folosite pentru aprecierea glucagonului total (GLI = glucagon like immunoreactivity), iar cele care au afinitate slabă pentru EG şi afinitate mare pentru PG sînt folosite pentru cantificarea PG (63).

Un antiser specific pentru PG trebuie să îndeplinească unele condiţii esenţiale (60).

— să reacţioneze slab sau deloc cu extract de jejun;

— să dea curbă doză-răspuns cu diluţii ale glucagonului plasmatic;

— să dea valori scăzute ale glucagonului plasmatic la încărcarea cu glucoză;

— să dea valori zero ale glucagonului plasmatic la animale cu pancreatectomie totală.

Asemenea antiseruri sînt rare (60, 63, 64). Titrurile obţinute sînt de: 1 : 10 000 — 1 : 100 000 la diluţia finală (60, 63).

C. *Trasorul.* Glucagonul porcin cristalizat este marcat cu ^{125}I prin metoda cu cloramina-T. Produsul de marcare este purificat pe coloană de Sephadex G—25 (60) sau G—75 (63), iar eluatele sînt culese în eprubete care conţin un inhibitor de tripsină, de exemplu 1 000 U de apronitină (Trasylol). Activitatea specifică este de 400—500 μ Ci/μ g. ^{125}I—Glucagonul

se conservă la —20°C și rămîne stabil 2 săptămîni, apoi trebuie repurificat (60).

D. *Preparatul standard.* Glucagonul porcin cristalizat (Lilly Research Laboratories, Indianapolis, Indiana 46206) este solubilizat în apă alcalinizată cu NaOH 1 N (cîteva picături la 10 ml apă) la concentrația de 1 mg/ml. Se fiolează în porții mici și se conservă la —70°C rămînînd stabil timp de un an (63). De aici se prepară concentrații progresive de la 25 la 2 000 pg/ml.

Pentru cantificarea EG în sisteme RIA cu antiser cu dublă specificitate nu există preparate pure de EG, de aceea se folosesc diluții seriate de PG și diluții seriate de extract intestinal. Dacă curbele sînt paralele (63), atunci se poate folosi PG ca standard.

E. *Probele de sînge.* Sînt necesare precauții speciale pentru a evita interferențele cu dozarea. În sistemul RIA pentru glucagon pot interveni complementul, enzimele proteolitice și alte proteine plasmatice (63). Se folosesc ca anti-complement: EDTA sau heparina. Împotriva efectului proteolitic al enzimelor se folosesc apronitină (Trasylol), mercaptoetanol sau benzanidină (65).

Se recoltează sîngele și se trece rapid în eprubete răcite care conțin cîte 1 000 U de apronitină pentru fiecare ml de sînge. Se separă rapid serul și se conservă la —20°C. Sau, se recoltează sînge în eprubete reci tapetate cu heparină și se centrifughează imediat în centrifugă cu răcire; se adaugă apoi cîte 1 000 U de apronitină per ml de ser. Dacă apronitina este în soluție, adaosul său la ser intră în calculul rezultatului (63).

Dacă interferența proteinelor serice nu poate fi evitată, se recurge la procedee de extracție a glucagonului din plasmă (61).

F. *Condiții de incubare.* Timpul de incubare este de aproximativ 4 zile la temperatura de 4°C. Pipetarea reactivilor se face la temperatura ambiantă. Volumul de incubare este ales în funcție și de tehnica de separare.

G. *Tehnica de separare.* Poate fi folosită orice tehnică de separare. În tehnica cu dublu anticorp se iau precauțiile necesare pentru a evita noi interferențe ale proteinelor plasmatice.

H. *Performanțele sistemului RIA*

Sensibilitatea tehnicii este de 25—40 pg/ml.

Specificitatea este considerată bună dacă EG nu interferează decît la concentrații de peste 1 000 pg/ml.

Precizia interserii este supravegheată cu ajutorul probelor de control.

Corespondența între rezultatele diferitelor laboratoare este dificilă deoarece preparatul standard și antiserurile prezintă diferențe (60, 63).

5.4.4. APLICAȚII CLINICE ȘI REZULTATE

PG este crescut în diabetul zaharat grav (65), în infecții, hemoragii, arsuri, în stress, în stările de hiperactivitate a SNV, la pacienții cu tumori care secretă glucagon (66) și la unii pacienți cu hipoglicemie „idiopatică" (67).

La normali adulți *à jeun*, cu glicemia ușor subnormală, concentrația PG este de 60—100 pg/ml, iar concentrația EG este de 300—330 pg/ml (63).

Scanned with OKEN Scanner

S-ar putea ca pentru interpretarea implicațiilor glucagonului în patologie să fie mai util raportul insulină / glucagon. De exemplu, la normali cu nivelul insulinei de 20 μ U/ml, raportul molar insulină / glucagon s-a arătat (63) că variază între 4 : 1 și 8 : 1.

BIBLIOGRAFIE

1. **Von Mering J., Minkowski O.** — Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 1889, *26*, 371.
2. **Paulescu N.** — Arch. Internat. Physiol., 1921, 17/1, 109.
3. **Banting F., Best C. H.** — J. Lab. clin. Med., 1922, *7*, 251.
4. **Kimball C. P., Murlin J. R.** — J. Biol. Chem., 1923, *58*, 337.
5. **Ryle A. P., Sanger F., Smith L. F., Kitai R.** — Biochem J., 1955, *60*, 541.
6. **Frieden E. H.** — Chemical Endocrinology, Academic Press Inc., New York, 1976, p. 83.
7. **Steiner D. F., Clark J. L., Nolan C., Rubenstein A. H., Margoliash M., Aten B., Oyer P. E.** — Recent Progr. Hormone Res., 1969, *25*, 207.
8. **Kipnis D. M.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow), Nort-Holland Publ. Co., Amsterdam, American Elsevier Publ. Co. Inc., New York, 1973, vol. 2 B, p. 827.
9. **Mayhen D. A., Wright P. H., Ashmore J.** — Pharmacol. Rev., 1969, *21*, 183.
10. **Dupre J.** — Ann. Rev. Med., 1970, 21, 299.
11. **Lacy P. E.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow), North Holland Publ. Co., Amsterdam, American Elsevier Publ. Co. Inc., New York, 1973, vol. 28, p. 840.
12. **Belloiu D.** — În: „Patologia Biochimică" (editat de I. Teodorescu Exarcu), Ed. medicală, București, 1974, p. 313.
13. **Williams R. H., Porte D., Jr.** — În: „Textbook of Endocrinology", ed. V (editat de R. H. Williams), Saunders Company, W. B., Philadelphia, 1974, p. 502.
14. **Simionescu L.** — Stud. Cercet. Endocrinol., 1971, *23*, 143.
15. **Pimstone B., Kronheim S., Berelowitz M.** — IAEA Res. Coord. Meet. on „In vitro Procedures and Techniques", Londra 29. XI—3. XII. 1976.
16. **Unger R. H., Orci L.** — Diabetes, 1977, *26*, 241.
17. **Gemmill C. L.** — Bull. Johns Hopkins Hosp., 1940, *66*, 232.
18. **Randle P. J.** — J. Endocrinol., 1956, *14*, 82.
19. **Haugaard N., Marsh J. B.** — J. Biol. Chem., 1952, *194*, 33.
20. **Winegrad A. I., Renild A. E.** — J. Biol. Chem., 1958, *322*, 273.
21. **Yalow R. S., Berson S. A.** — J. Clin. Invest., 1960, *39*, 1 157.
22. **Yalow R. S., Berson S. A.** — În: „Principles of Competitive Protein Binding Assays" (editat de W. D. Odell și W. H. Daughaday), Lippincott Co., J. B., Philadelphia, 1971, p. 1.
23. **Schlichtkrull J., Branke J., Christiansen A. H., Hallund O., Heding I. G., Jorgensen K. R.** — Diabetes, 1972, *21 / Supl. 2*, 649.
24. **Rott M. A., Chance R. E., Galloway J. A.** — Diabetes, 1972, *21 / Supl. 2*, 657.
25. **Moloney P. J., Goldsmith L.** — Can. J. Biochem. Physiol., 1957, *35*, 79.
26. **Makulu D. R., Wright P.** — Metabolism, 1971, *20*, 770.
27. **Starr J. I., Rubenstein A. H.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press Inc., New York, 1974, p. 289.
28. **Wilson M. A., Miles L. E. M.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York, 1977, p. 275.
29. **Cantrell J. W., Hochholzer J. M., Frings C. S.** — Clin. Chem., 1972, *18*, 1 423.
30. **Melani F., Rubenstein A. H., Steiner D. F.** — J. clin. Invest., 1970, *49*, 497.
31. **Melani F., Rubenstein A. H., Oyer P. E., Steiner D. F.** — Proc. nat. Acad. Sci., (Wash.), 1970, *67*, 148.
32. **Roth J., Gorden F.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Jalow), North Holland Publ. Co., Amsterdam, American Elsevier Publ. Co. Inc., New York, 1973, p. 876.
33. **Dunlop M., Court J. M.** — Clin. Chim. Acta., 1974, *52*, 257.
34. **Turner R. C., Harris D.** — Lancet, 1974, *2*, 188.
35. **Turner R. C., Oakley N. W., Nabarro J. D. N.** — Brit. med. J., 1971, *2*, 132.

Scanned with OKEN Scanner

36. Cahill S. F., Herrera M. G., Morgan A. P., Soeldner J. S., Steinke J., Levy P. L., Elichard G. A., Kipnis D. M. — J. clin. Invest., 1966, *45*, 1 751.
37. Turner R. C., Oakley N. W., Nabarro J. D. N. — Metabolism, 1973, *22*, 111.
38. Heding L., Turner R. C., Harris F. — Diabetes, 1975, *24 / Supl. 2*, Abstr. 80.
39. Kumar D., Mehtalia S. D., Miller L. V. — Ann. intern. Med., 1974, *80*, 697.
40. Marks V. — Gut, 1971, *12*, 835.
41. Floyd J. C. Jr., Fayans S. S., Knopf R. F., Conn J. W. — J. clin. Endocr., 1964, *24*, 747.
42. Hansen A. F. — J. clin. Invest., 1970, *49*, 467.
43. Fayans S. C., Floyd J. C. Jr., Knopf R. F., Guntsche E. M., Rull J. A., Thiffaul C. A. — J. clin. Endocr., 1967, *27*, 1 600.
44. Grunt J. A., Pallotta J. A., Soeldner J. St. — Diabetes, 1970, *19*, 122.
45. Merimée T. J., Tison J. E. — Diabetes, 1977, *26*, 161.
46. Clark J. L., Cho S., Rubenstein A. H., Steiner D. F. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1969, *35*, 456.
47. Rubenstein A. H., Clark J. L., Melani F., Steiner D. F. — Nature (Lond.), 1969, *224*, 697.
48. Oyer P. E., Cho S., Peterson J., Steiner D. F. — J. Biol. Chem., 1971, *246*, 1 375.
49. Block M. B., Mako M. E., Steiner D. F. — Diabetes, 1972, *21*, 1 013.
50. Staub A., Sinn L. G., Behrens O. K. — J. Biol. Chem., 1955, *214*, 619.
51. Bromer W. W., Sinn L. G., Behrens O. K. — J. Amer. Chem. Soc., 1957, *79*, 2 807.
52. Wunnsch E. — Z. Naturforsch., 1967, *B 22*, 1 269.
53. Thomsen J., Kristiansen K., Brunfeldt K., Sundby F. — FEBS Lett., 1972, *21*, 315.
54. Bromer W., Behrens O. K. — Methods Horm. Res., 1962, *2*, 163.
55. Unger R. H., Eisentraut A. M., McCall M. S., Madison L. I. — J. Clin. Invest., 1961, *40*, 1 280.
56. Makman M. H., Sugherland W. E. — Endocrinology, 1964, *75*, 127.
57. Unger R. H., Eisentraut A. M., McCall M. S., Keller S., Lanz H. C., Madison L. S. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1959, *102*, 621.
58. Berson S. A., Yalow R. S. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1959, *82*, 388.
59. Bromer W. W., Boucher M. E., Koffenberger J. E. — J. Biol. Chem., 1971, *246*, 2 822.
60. Faloona G. R., Unger R. H. — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press, Inc., New York, 1974, p. 317.
61. Heding J. G. — În: „Glucagon: Molecular Physiology, Clinical and Therapeutic Implications" (editat de P. Lefébvre și R. H. Unger), Pergamon Press Ltd., Oxford, 1972, cp. 12, p. 187.
62. Assan R., Slusher N. — Diabetes, 1972, *21*, 843.
63. Foa P. P. Matsuyama T., Foa N. — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York, 1977, p. 299.
64. Eisentraut A. M., Ohneda A., Parada E., Unger R. H. — Diabetes, 1968, *17* (Supl. 1), 321.
65. Ensinck J. W., Shepard C., Dudl R. J., Williams R. H. — J. clin. Endocr., Metab., 1974, *35*, 463.
66. Dobbs R., Sakurai H., Sasaki H., Faloona G., Valverde I., Baltens D., Orci L., Unger R. — Science, 1975, *187*, 544.
67. Mallinson C. N., Bloom S. R., Warin A. P., Salmon P. R., Cox B. — Lancet, 1974, *2*, 1.
68. Loreti L., Klein S. P., Foa P. P. — Clin. Res., 1974, *22*, 475 A.
69. Simionescu Ligia, Oprescu Maria, Mirodon Zenaida — Rev. Roum. Endocrinol., 1979, *17*, *3*, 191,

Scanned with OKEN Scanner

6

SISTEMUL RENINĂ-ANGIOTENSINĂ- ALDOSTERONĂ (RAA)

6.1. INTRODUCERE ŞI CONSIDERAŢII GENERALE

Sistemul renină-angiotensină-aldosteronă (RRA) este alcătuit din proteine plasmatice, renale şi pulmonare care interacţionează între ele dar şi cu un mineralocorticoid suprarenal — aldosterona. Sistemul are rol în reglarea homeostaziei volumului sanguin, a sodiului şi a potasiului şi are efecte asupra contracţiei muşchiului neted şi asupra reactivităţii sistemului nervos. Este unul din cele mai complexe sisteme, fiind supus nu numai propriei sale autoreglări dar şi numeroaselor influenţe reglatoare, care îi modelează activitatea modificînd simultan una sau mai multe componente (fig. II.6.1).

6.1.1. FIZIOLOGIE

Subsistemul renină-angiotensină este format din renină, substrat plasmatic şi o enzimă de conversie din a căror interacţiune se formează angiotensine (I şi II).

Renina este o enzimă proteolitică renală eliberată din celulele aparatului juxtaglomerular; ea acţionează asupra unei α_2-globuline plasmatice (produsă în ficat) — substratul sau angiotensinogenul — pentru a elibera un decapeptid inactiv, angiotensina I. Sub acţiunea unei enzime de conversie cu sursa principală în plămîn, angiotensina I este scindată rapid pentru a forma un octapeptid — angiotensina II. Enzimele proteolitice produc scindarea şi degradarea angiotensinei II (fig. II.6.2.).

Renina este eliberată din rinichi ca răspuns la o varietate de stimuli fiziologici şi patologici care au comun reducerea circulaţiei în glomerulul renal. Reducerea circulaţiei mai poate stimula eliberarea reninei şi pe calea unor reflexe cu originea în cord şi în creier. Renina mai este eliberată şi ca răspuns la stimuli chimici ca sodiul şi unele medicamente.

Angiotensinele influenţează calibrul vaselor sanguine şi volumul intravascular. Influenţa asupra calibrului vaselor este mediată prin efectele directe asupra vaselor sanguine şi asupra sistemului nervos vegetativ. Efectul asupra

Scanned with OKEN Scanner

volumului sanguin este mediat de acţiunea asupra corticalei suprarenale (CSR) de creştere a secreţiei aldosteronei. Angiotensinele au efecte directe şi asupra cordului, rinichiului, SNC şi asupra altor organe (1).

Se pare că diferitele angiotensine au efecte individuale asupra organelor ţintă. Astfel, angiotensina I influenţează în primul rînd SNC şi medulara

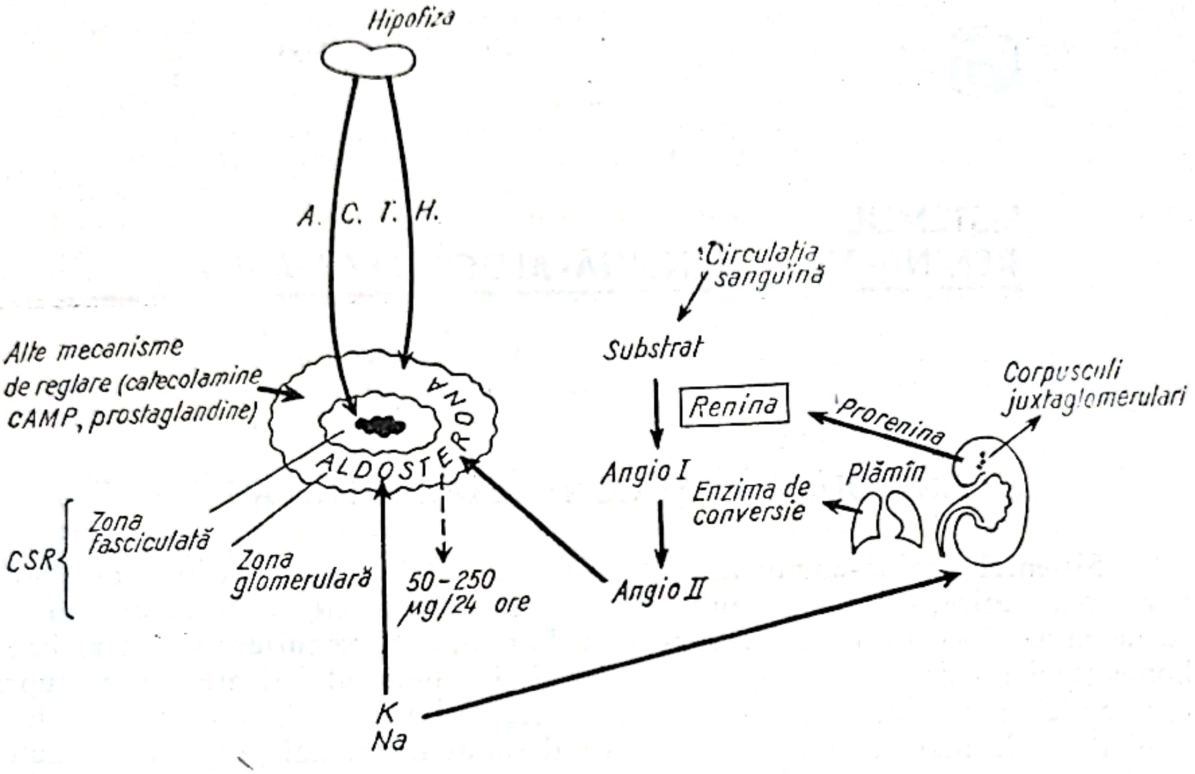


Fig. II.6.1. Reprezentarea schematică a sistemului renină-angiotensină-aldosteronă (după referinţa 1 modificat).

suprarenală, angiotensina II influenţează vasele sanguine şi *feedback*-ul eliberării reninei, pe cînd angiotensina III influenţează glomerulara suprarenală şi unele procese biochimice intracelulare.

Renina nu are altă activitate biologică intrinsecă decît aceea de a iniţia secvenţa de procese proteolitice care formează angiotensinele din precursorul inactiv. Substratul reninei are numai o funcţie cunoscută: precursor stabil pentru angiotensine.

Renina este produsul aparatului juxtaglomerular renal, de aceea eliberarea reninei reflectă starea circulaţiei sistemice şi renale şi starea de sănătate a celulelor juxtaglomerulare. Angiotensinele plasmatice sînt mediatori ai răspunsului renal umoral la circulaţie redusă. Deci, dacă se studiază eficienţa circulaţiei sau starea de sănătate a rinichiului, se urmăreşte nivelul şi rata eliberării reninei. Dacă însă se studiază participarea subsistemului renină-angiotensină la o anumită stare clinică, atunci se urmăreşte nivelul polipeptidelor active în plasmă şi în ţesuturile ţintă, precum şi răspunsul organelor ţintă la angiotensine. O altă cale de a controla contribuţia subsistemului renină-angiotensină la o stare clinică este aceea de a urmări antagoniştii angiotensinei ale căror efecte sînt proporţionale cu contribuţia angiotensinei (2).

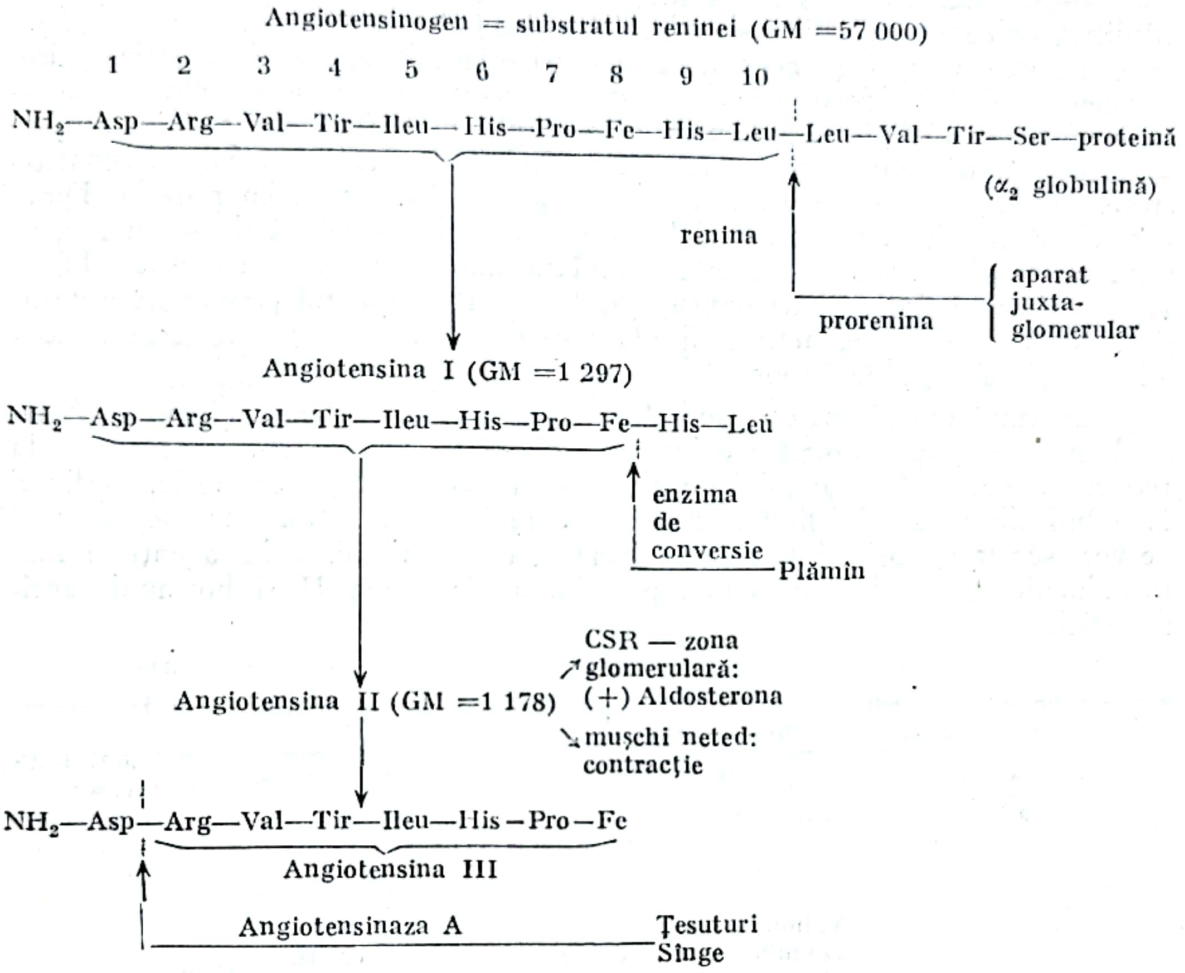
Elementele efectoare ale sistemului, implicate în acţiunea hormonală la nivelul celulelor ţintă, sînt angiotensina II şi aldosterona.

Scanned with OKEN Scanner

La om, în condiţii normale, *renina* se află sub diferite influenţe:

Postura. În poziţie orizontală, activitatea reninei este mai redusă decît în poziţia verticală.

Ritmurile biologice. Activitatea reninei prezintă valori maxime între orele 24 şi 8 în poziţie orizontală. Starea de somn nu pare esenţială pentru



Legendă: (+) = creşte; - - - = scindare enzimatică.

Fig. II.6.2. Subsistemul renină-angiotensine la om.

creşterea nocturnă (3); creşte în faza luteală probabil prin efectul natriuretic al progesteronei.

Balanţa sodică. Activitatea reninei este supresibilă prin ingestia unei cantităţi mari de Na şi creşte în timpul dietei hiposodate. Potasiul ingerat are efecte similare dar mai puţin importante.

Vîrsta, sexul. Valori crescute ale activităţii reninei se observă în perioada postnatală. Nu sînt diferenţe esenţiale între sexe.

Sarcina. Activitatea reninei şi concentraţia substratului încep să crească din primele săptămîni după nidare şi persistă pînă la termen.

Estrogenii. Medicamentele anticoncepţionale şi orice preparate cu estrogeni cresc concentraţia substratului cu efect de creştere variabil asupra activităţii reninei (4).

Scanned with OKEN Scanner

Se pare că numeroşi factori, care influenţează secreţia reninei, operează prin două mecanisme intrarenale majore:

— un baroreceptor în arteriolele aferente, care răspunde la modificările de tensiune ale peretelui vascular şi este modulat de nervii simpatici ai rinichiului (5, 6, 7);

— un receptor sensibil la sodiu în *macula densa*, care reacţionează la modificările conţinutului în sodiu din lichidul tubular (8).

Secreţia reninei şi activitatea reninei plasmatice, ca şi secreţia aldosteronei şi nivelul aldosteronei plasmatice prezintă, în mare, o relaţie inversă cu ingestia sodiului şi cu concentraţia sa în plasmă. Efectele potasiului asupra secreţiei reninei sînt similare cu ale sodiului şi anume renina plasmatică creşte în timpul depleţiei de potasiu şi scade la încărcarea cu potasiu. Dimpotrivă, alterarea balanţei potasiului are acţiune inversă faţă de sodiu asupra secreţiei de aldosteronă, care este stimulată după administrarea potasiului şi scade în timpul depleţiei de potasiu (9, 10). Astfel, aportul crescut de potasiu poate duce la scăderea activităţii plasmatice a reninei şi la creşterea concomitentă a secreţiei aldosteronei.

Sistemul renină-angiotensină-aldosteronă este un sistem biologic cu *feedback* negativ (fig. II.6.3.) Renina este eliberată din rinichi ca răspuns la reducerea volumului sanguin efectiv sau a reducerii concentraţiei sodiului în tubul distal al rinichiului. Eliberarea reninei este modulată de sistemul nervos vegetativ prin intermediul inervaţiei rinichiului, prin agenţi simpaticomimetici umorali, prin sodiu, potasiu, angiotensina II şi hormonii antidiuretici.

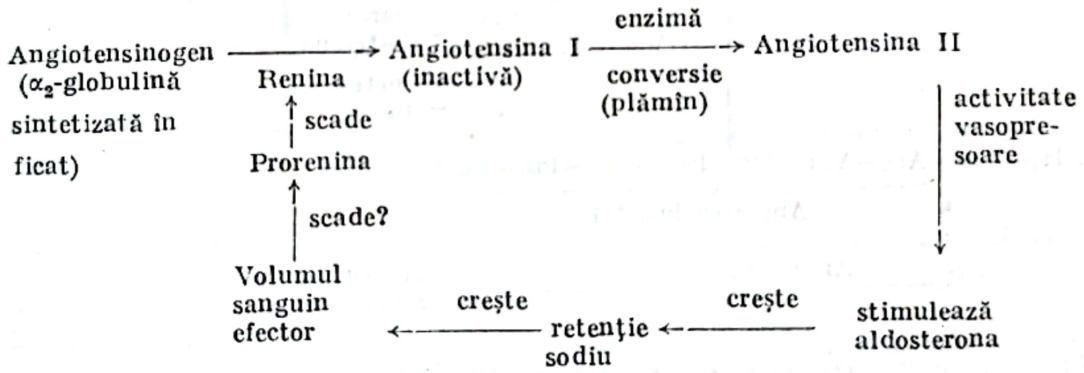


Fig. II.6.3. Feedback negativ în sistemul renină-angiotensină-aldosteronă.

Aldosterona este sintetizată în zona glomerulară a CSR. Acţiunile majore ale aldosteronei se exercită la nivelul transportului ionilor în tubul renal distal unde creşte reabsorbţia sodiului şi excreţia potasiului. La normali, eliberarea aldosteronei în circulaţie este controlată predominant de dieta sodică şi potasică dar şi alţi factori ca postura şi stress-ul îi pot modifica secreţia şi metabolismul (11). Modul în care balanţa electrolitică ajunge să influenţeze celulele glomerulare ale suprarenalei este complex şi sînt implicate mai multe mecanisme. Dintre acestea, cîteva sînt mai bine demonstrate:

— sistemul renină-angiotensină prin intermediul angiotensinei II;
— un efect direct al potasiului seric;
— acţiunea directă a ACTH;
— concentraţia redusă a sodiului seric;
— factori care pot opera în timpul depleţiei de sodiu.

Scanned with OKEN Scanner

Rata secreției aldosteronei, la normali, este de 75—150 μg/zi iar semiviața de 20—30 minute; rezultă că este metabolizată rapid deoarece nu este legată specific de vreo proteină plasmatică. Nivelul plasmatic la normali este de *5—15 ng/100 ml* cu valorile cele mai mici în poziția orizontală. Calea principală de excreție este rinichiul. Numai aproximativ 0,2% din aldosterona circulantă se elimină nemodificată, restul apare în urină sub formă de metaboliți ca tetrahidroaldosterona conjugată cu acid glucuronic cu o rată de excreție de 15 μg/zi, la normali cu regim alimentar obișnuit. În situațiile clinice cu aldosteronă crescută, balanța sodică pozitivă determină creșterea sodiului în organism și hipertensiune, iar pierderea sodiului determină hipopotasemie.

6.1.2. PATOLOGIA SISTEMULUI RENINĂ-ANGIOTENSINĂ-ALDOSTERONĂ (RAA)

Sistemul RAA este stimulat în multe situații fiziologice ca trecerea de la poziția orizontală la cea verticală, în situații patologice ca hemoragia, privarea sau pierderea sodiului prin diuretice sau prin cauze locale ca stenoza arterei renale.

Perturbările sistemului RAA sînt clasificate în hiper- și în hipoaldosteronism (tabelul II.6.1.) și în stări clinice cu suprimare sau cu creștere a secreției reninei (12).

Tabelul II.6.1.

Variațiile reninei în hiper- și hiposecreția aldosteronei (după referința 12)

Originea	Starea sau forma clinică	Renina
Hiperaldosteronism CSR	Hiperaldosteronism primar prin adenom (sindrom Conn) Hiperaldosteronism pseudoprimar prin hiperplazie CSR bilaterală	scade
Hiperaldosteronism extra-CSR	Stări edematoase: ciroza nefroza insuficiența cardiacă Stări cu hipertensiune: hipertensiune malignă prin boală renală unilaterală Alcaloză cu normotensiune: hiperplazia celulelor juxtaglomerulare cu deperdiție de K și creștere întîrziată (sindrom Bartter)	crește
Hipoaldosteronism CSR	Insuficiența CSR { autoimunitară / TBC	crește

Diagnosticul hiperaldosteronismului primar se bazează pe asocierea: hipertensiune, hipokaliemie, aldosteronă crescută și valori circulante reduse ale reninei și ale angiotensinei II.

În *hiperaldosteronismul secundar* unor cauze extrasuprarenale, activitatea reninei plasmatice și nivelul angiotensinei II și al aldosteronei sînt crescute.

Scanned with OKEN Scanner

6.1.3. INVESTIGAREA SISTEMULUI RAA

Aceasta se poate face determinînd activitatea reninei plasmatice (PRA) sau a concentrației reninei plasmatice (PRC) măsurînd decapeptidul inactiv — angiotensina I — ca indicator, prin dozarea angiotensinei II și prin dozarea aldosteronei plasmatice și/sau urinare. Se mai poate determina concentrația substratului. Selectarea celor mai potrivite combinații de determinări se face în funcție de scopul urmărit, de exemplu măsurarea concentrației substratului prezintă interes mai mult pentru cercetare decît pentru diagnosticul clinic (13). Au fost propuse unele strategii orientative cu scopul de a sonda sistemul RAA (tabelul II.6.2.).

Tabelul II.6.2.

Etapele investigației sistemului RAA
(după referința 14)

Situația clinică	Semne patognomonice	Analiza	
		etapa I	etapa II
Hiperaldosteronism primar	Hipertensiune Hipokaliemie nedatorată diureticelor	aldosterona	dacă aldosterona este crescută, se dozează PRA[a] sau A II
Hiperaldosteronism — secundar cauze renale	Hiponatriemie Hipokaliemie	aldosterona	dacă aldosterona este crescută, se dozează PRA sau A II
— tumori secretante de renină	Hipertensiune gravă Hipokaliemie la tineri	aldosterona, PRA sau AII	
— hipertensiunea incurabilă din insuficiența renală cronică	Hipertensiune nemodificabilă prin dializă sau medicamente	PRA sau AII	
— hipokaliemie inexplicabilă	Hipokaliemie în absența terapiei cu diuretice	aldosterona	PRA sau A II

[a] PRA = activitatea reninei plasmatice (*Plasma Renin Activity*)

6.1.4. PREGĂTIREA PACIENTULUI ȘI A PROBELOR DE SÎNGE PENTRU INVESTIGAREA SISTEMULUI RAA

Ca și aldosterona, PRA și angiotensina II variază invers cu volumul plasmatic. În plus, variază cu activitatea sistemului nervos vegetativ. De aceea se întrerupe administrarea substanțelor diuretice și a celor cu acțiune asupra SNV timp de 3 săptămîni înainte de colectarea probelor. În acest interval, pacientul nu primește cantități suplimentare de potasiu. Pacientul este spitalizat și cel puțin 3 zile înainte de recoltarea sîngelui el ingeră 2—3 g de sodiu și de potasiu în 24 de ore (tabelul II.6.3.).

Prima probă de sînge se recoltează dimineața între orele 8 și 9 după ce pacientul a dormit culcat 8 ore fără ca în acest interval să se ridice. A

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 11.6.3.

Investigarea RAA în plasma periferică în condiţii bazale şi în proba de stimulare

Pacientul	Condiţii
Prespitalizare	3 săptămîni întrerupe orice medicaţie care modifică volumul sanguin (diuretice), au acţiune asupra SNV (anestezice generale, propranolol, vasodilatatoare puternice, antihipertensive, α-metildopa etc.); nu: mineralocorticoizi; nu: cantităţi suplimentare de K
	Baza
Spitalizare	3 zile: ingeră cîte 2—3 g (120 mEq) Na şi 2—3 g (80 mEq) K pe zi; se controlează tensiunea arterială; se determină înainte de probă Na, K, urec în sînge; cu 12 ore înainte de prelevarea sîngelui, începe colectarea urinii pentru măsurarea Na
I priză de sînge	dimineaţa, pe nemîncate, între orele 8 şi 9, după 8 ore de somn, timp în care nu se ridică din pat; nu se ingeră volume mari de lichide înainte de probă;
II priză de sînge	la 2 ore după prima priză, timp în care pacientul se plimbă liniştit, evitînd agitaţia, eforturile, emoţiile
	Stimulare
spitalizare	3 zile restricţie de sodiu: ingeră dietă cu 0,25 g (10 mEq) Na, suplimentată cu 2—3 g (80 mEq) K; după aceste 3 zile pacientul se cîntăreşte;
	dimineaţa la ora 7 pacientul se ridică în picioare şi nu se culcă timp de 4 ore, interval în care are o activitate obişnuită
priza de sînge	la ora 11

Sîngele	Proceduri
Volum	10 ml per priză sînge venos din vena cubitală în vase heparinate sau cu EDTA;
Manevre	recoltare rapidă: *sub 1 minut*, evitînd traumatismul de venepuncţie;
Centrifugare	*imediat* după recoltare, la +4°C;
Conservare	la —20°C, imediat după centrifugare şi separarea plasmei de hematii;
Transport	numai în stare congelată;
Utilizare	PRA[a], PRC[b], A I[c], A II[d], A III[e], aldosterona
Observaţii	Probele păstrate la temperatura camerei şi cele hemolizate sînt inutilizabile!

a = activitatea reninei plasmatice;
b = concentraţia reninei plasmatice;
c d e = angiotensina I, II şi III.

Scanned with OKEN Scanner

doua probă se recoltează după ce pacientul s-a ridicat în picioare şi s-a plimbat liniştit timp de 2 ore.

Probele de sînge, în volum de 10 ml, deoarece se dozează şi aldosterona pe aceleaşi eşantioane, sînt colectate în vase heparinate sau cu EDTA (pentru a inhiba angiotensinazele). Recoltarea se face rapid (sub 1 minut) deoarece A II are $T_{1/2}$ de aproximativ *un minut*. Centrifugarea se face *imediat* la +4°C, iar după separarea hematiilor plasma este conservată de urgenţă la —20°C. Probele de sînge care au fost păstrate la temperatura camerei sau sînt hemolizate se aruncă: prelucrarea lor înseamnă pierdere de timp şi de materiale.

Biletul de însoţire a probelor de plasmă conţine, în afara datelor uzuale, următoarele date: medicamentele administrate, tensiunea arterială, nivelul Na, K, uree. Cu 12 ore înainte începe colectarea urinii pentru dozarea sodiului.

În servicii speciale, dotate cu facilităţi chirurgicale şi radiologice, se poate recolta sînge şi din vena renală sau din cea suprarenală (tabelul II.6.4.). După cateterizare, se poate recolta sînge din ambele vene renale şi din cava inferioară, fie la origine, fie sub orificiile venelor renale şi deasupra orificiilor ambelor vene renale. În probele de sînge se dozează şi cortizolul care atestă inserţia corectă a cateterului.

Tabelul II.6.4.

Investigarea RAA în plasma din vena renală sau suprarenală

Pacientul	Condiţii
Spitalizare	Acelaşi ca şi pentru sînge periferic
	Cateterizarea venei renale (dreapta sau stînga) sau a venei suprarenale (dreapta sau stînga) după un protocol stabilit de specialişti
Priza de sînge	Se recoltează 10 ml sînge, care se prelucrează ca şi sîngele periferic

6.1.5. APLICAŢIILE CLINICE ALE INVESTIGĂRII SISTEMULUI RAA

a) *PRA şi A II*

— dozarea este decisivă în diagnosticul diferenţial între hiperaldosteronismul primar şi secundar;

— este utilă în decizia pentru nefrectomie totală la bolnavi cu insuficienţă renală cronică;

— este una din metodele care permit să se precizeze dacă hipertensiunea la un bolnav cu stenoza arterei renale va răspunde la corectarea chirurgicală a stenozei.

Bolnavii sub 45 de ani, cu hipertensiune arterială şi hipopotasemie spontană reprezintă grupul clinic cel mai indicat pentru dozarea PRA şi A II.

b) *Aldosterona în sînge şi în urină*

Pregătirea bolnavului, modul de prelevare a probelor de sînge şi indicaţiile clinice sînt similare celor menţionate pentru măsurarea PRA şi A II.

Scanned with OKEN Scanner

Aldosterona urinară se determină în urina colectată în 24 de ore într-un vas care conține 10 ml acid boric 10%, ca conservant. În timpul colectării urinii, bolnavul nu este obligat să stea culcat. După măsurarea volumului, se trimite imediat la laborator un volum de 2,5 ml însoțit de un buletin pe care sînt înscrise aceleași date ca și pentru sînge, în plus se notează și volumul urinii.

Dozarea aldosteronei în sînge și în urină este utilă pentru investigarea bolnavilor cu hipertensiune arterială și hipopotasemie suspectați de hiperaldosteronism primar (sindrom Conn) și de asemenea cei suspectați de hiperaldosteronism secundar datorat stenozei arterei renale sau unei tumori care secretă renină.

Alte indicații ale dozării sînt: hipoaldosteronismul primar în care se observă hiperpotasemie cu episoade de insuficiență renală, hipopotasemie spontană ș.a. La pacienții cu perturbări ale secreției aldosteronei se dozează fie simultan, fie după constatarea anomaliei hormonale și alte elemente ale sistemului adică PRA sau A II.

Măsurarea aldosteronei *nu* este utilă în cazul bolnavilor cu hipertensiune renovasculară malignă sau esențială cu normopotasemie și nici la bolnavi cu insuficiență cardiacă, sindrom nefrotic, ciroză sau edem idiopatic.

6.2. RADIOIMUNOANALIZA ELEMENTELOR SISTEMULUI RAA

Au fost dezvoltate sisteme RIA pentru măsurarea directă a angiotensinei I, II, III, a substratului reninei și a aldosteronei. Activitatea reninei (PRA) și concentrația reninei plasmatice (PRC) sînt cantificate indirect din rezultatul măsurării angiotensinei I.

Măsurarea angiotensinelor prin RIA este complicată prin capacitatea plasmei de a forma polipeptide *in vitro* și prin susceptibilitatea acestor polipeptide la intervenția unor enzime prezente în majoritatea lichidelor biologice și a extractelor tisulare. În plus, angiotensinele, la concentrațiile joase din plasmă, sînt ușor adsorbite pe o varietate de suprafețe.

Sistemele RIA pentru angiotensina I, II și pentru aldosteronă sînt cele uzuale.

6.2.1. RADIOIMUNOANALIZA ANGIOTENSINEI I

A. *Introducere.* Angiotensina I (A I) este un decapeptid inactiv cu GM de 1 296 daltoni, generat prin acțiunea reninei asupra substratului, de aceea măsurarea sa în plasmă sau țesut permite calculul indirect al PRA sau al PRC.

Estimarea activității reninei și a substratului reninei prin metode biologice se bazează pe răspunsul presor al șobolanului la A I și A II generate într-un amestec de renină-substrat. Sisteme biologice similare sînt utilizate pentru a măsura nivelul plasmatic al A II, al enzimelor de conversie și al angiotensinazelor (12, 13, 14). Aceste metode au permis identificarea unor peptide cu activitate reninică în unele țesuturi glandulare ca pineala de șobolan (15). Compararea rezultatelor obținute prin metodele biologice cu cele furnizate de RIA corelează la coeficienți peste 0,9 (16). Totuși, metodele biologice sînt laborioase și greu de standardizat. Metoda RIA pentru A I a fost realizată în 1969 (17).

Scanned with OKEN Scanner

A I folosită pentru imunizare și pentru radioiodurare este un produs de sinteză disponibil pe cale comercială.

B. *Imunogenul.* A I este un imunogen slab, de aceea se folosește conjugatul de A I cu proteine (18, 19).

C. *Antiserul.* Imunogenul emulsionat în adjuvant este injectat la iepure în doze de 1—2 mg de conjugat per animal în multiple locuri. Se repetă injecțiile pînă se obțin titruri convenabile. Uneori este recomandabil ca injecțiile de rapel să fie făcute cînt titrul începe să scadă, deci la intervale mai mari de 2 săptămîni. Antiserul este tratat prin încălzire la 60° timp de 20 de minute pentru a distruge enzimele plasmatice; se adaugă mertiolat și se conservă la —20°C.

D. ^{125}I—*Angiotensina I.* Molecula de A I posedă un nucleu tirozinic, care permite iodurarea directă prin una din metodele uzuale, de exemplu cu Cloramina-T urmată de purificare pe DEAE—Sephadex A 25. Adsorbția este redusă prin presaturarea coloanei cu albumină. Se obțin activități specifice de ordinul a 2 000 μ Ci/μg. A I marcată se conservă la — 20°C diluată, de exemplu în soluție glicină-NaCl-fosfat-albumină, rămînînd stabilă cîteva luni.

E. *Preparatul standard* de A I este A I (Asp^1—Ileu^5) sintetică 71/328 oferită de Medical Research Council, Division of Biological Standards, National Institute for Medical Research, Hampstead Laboratories, Holly Hill, Londra, Anglia.

F. *Probele biologice.* Numeroase substanțe prezente în plasmă interferează în dozarea A I. Reducerea interferenței prin diluarea probelor nu este posibilă deoarece nivelul A I este aproape de limita de sensibilitate a tehnicii. De aceea se recurge fie la pretratarea plasmei (18, 19), fie la folosirea unor substanțe cu acțiune inhibitoare asupra enzimei de conversie și a angiotensinazelor ca de exemplu EDTA în concentrație de 2,6 mM, dimercaprol 1,6 mM, 8-hidroxichinolin sulfat 3,4 mM (17).

În probele de plasmă care conțin concentrații mari de renină, chiar cînd sînt păstrate la —20°C, concentrația A I crește treptat în timpul conservării, ceea ce duce la inconvenientul că valoarea la momentul zero apare crescută în momentul dozării. În plus, s-a demonstrat că renina poate să existe sub forma de proenzimă (20, 21), iar conservarea sau acidifierea plasmei poate converti prorenina în renină (19). Aceasta duce la valori progresiv crescute odată cu creșterea intervalelor de la prelevare la prelucrare. Semnificația fenomenului nu este cunoscută și nici nu poate fi stăpînită, ceea ce duce la un plus de variație în rezultatele măsurării reninei. Mai mult, au fost descrise în plasmă substanțe activatoare și inhibitoare ale reninei (22), a căror concentrație și stabilitate variabilă face încă mai dificilă standardizarea conservării probelor de plasmă (19).

G. *Tehnica de separare* frecvent folosită este adsorbția ^{125}I—A I liberă pe cărbune-dextran.

H. *Incubarea reactivilor.* pH-ul sistemului de incubare este menținut la 7,4 cu ajutorul sistemelor tampon uzuale, la care se adaugă conservant și inhibitori enzimatici. Pentru a preveni infectarea cu apariția unui surplus de enzime proteolitice, se preferă soluții tampon sterile sau preparate cu apă bidistilată sau deionizată sterilă. În RIA pentru A I, după adăugarea soluției tampon și a inhibitorilor, probele de plasmă sînt supuse procedeului de preincubare anume fiecare probă de plasmă se pipetează în cîte 2 eprubete:

Scanned with OKEN Scanner

una se incubează 3 ore la 37°C, iar cealaltă se menţine 3 ore la 0—4°C. Restul procedeelor, inclusiv separarea, se fac la 0—4°C. Eprubeta incubată la 37°C serveşte pentru măsurarea indirectă a reninei prin intermediul cantităţii de A I generată la această temperatură. Din diferenţa, în ng/ml de A I la 37°C şi la 4°C se calculează PRA.

I. *Performanţele sistemului RIA*

Specificitatea: Angiotensina II, III şi substratul nu interferează în sistem, dacă antiserul este foarte specific şi incubările de scurtă durată.

Sensibilitatea: 0,1 ng/ml/oră cu volume de plasmă de 50 µl.

Precizia: CV% intraserică — 3% şi interserii — 8—10%.

J. *Rezultate* (tabelul II.6.5.).

La normali, în poziţie orizontală, cu o ingestie de sodiu de 110 mEq, PRA exprimată în ng A I/ml/oră este de 2 ng±1,0 şi creşte la 3 ng±0,5 la o ingestie de sodiu de 10 mEq.

La normali, în poziţie verticală, cu o ingestie de 10 mEq Na, PRA creşte la 10±4 ng A I/ml/oră. Valori similare sînt observate după diuretice.

Tabelul II.6.5.

Variaţiile activităţii reninei plasmatice (PRA)

Influenţe asupra reninei	Mecanismul	Rezultatul
Poziţia verticală		creşte
Restricţie de Na	scade Na, K	creşte
Diuretice (administrare acută)	scade volumul intravascular	creşte de 10 ori
Hemoragie		creşte de 6 ori
Poziţie verticală plus restricţie Na		creşte de 2 ori
Poziţie orizontală plus restricţie Na		creşte
Antihipertensive		
hidralazidă		creşte
diazoxid	creşte substratul	creşte
Estrogeni	revenirea volumului	
Diuretice	sanguin aproape de normal	scade progresiv
(administrare cronică)	blocaj adrenergic	scade
— metil DOPA	retenţie săruri şi apă	suprimă
Aldosteronă (sindrom Conn)	alterarea perfuziei glomerulare	creşte
Hipertensiune reno-vasculară		

K. *Truse RIA pentru A I* sînt disponibile pe cale comercială. În România, o astfel de trusă este realizată de IMF—Timişoara.

6.2.2. RADIOIMUNOANALIZA ANGIOTENSINEI II

Sistemul RIA pentru angiotensina II (A II), este similar sistemului RIA pentru A I. Diferenţa constă în folosirea angiotensinei II ca antigen, pentru radioiodurare şi ca preparat standard.

A II este un octapeptid cu GM de 1 178 daltoni, rezultat din scindarea decapeptidului A I sub acţiunea enzimei de conversie.

A. *Imunogenul.* A II sintetică se poate obţine pe cale comercială din aceleaşi surse ca şi A I. Conjugată cu o proteină (albumină, tiroglobulină

Scanned with OKEN Scanner

porcină) și emulsionată în adjuvant Freund, servește ca imunogen pentru obținerea antiserurilor.

B. *Antiserul.* Iepuri (Chinchilla) injectați cu 1—3 mg de conjugat produc antiseruri utilizabile în RIA la diluții de 1 : 1 000—1 : 60 000. Sînt selecționate, indiferent de titru, acele antiseruri care sînt specifice pentru A II, ceea ce înseamnă că A I nu interferează practic în sistem. Comparativ cu serurile anti-A I, serurile anti-A II sînt mai puțin specifice; ele reacționează încrucișat cu o serie de analogi ai A II, unele antiseruri reacționînd mai puternic cu metaboliți ai A II decît cu A II (18).

C. *Trasorul* se prepară și se conservă în aceleași condiții ca și A I.

D. *Standardul* este A II. Standardul de cercetare A (Asp^1 Ileu^5) sintetic 70/302 este oferit de oficiul de standarde Londra (vezi 6.2.1.).

E. *Condiții de incubare.* În scopul creșterii sensibilității, se prevede un interval de preincubare cu antiserul de aproximativ 6 ore, urmat de 24 de ore incubare cu trasorul. Ambele incubări se fac la 0—4°C. Mediul de incubare conține inhibitori ai degradării enzimatice, de exemplu 8-hidroxichinolină și dimercaprol sau diisopropil-fluorofosfat (DFP). DFP este un toxic puternic (inhibă colinesteraza și alte enzime vitale); de aceea, se păstrează la îndemînă o soluție de NaOH 2 g% atunci cînd se manevrează flaconul cu DFP, și, în caz de accident, se aruncă flaconul în soluția de hidroxid, ca și toate reziduurile.

Pentru a urmări interferențe ale plasmei în sistem, se prepară soluțiile standard în plasmă fără A II.

F. *Performanțele sistemului RIA pentru* A II

Specificitatea. Antiserurile sînt rareori strict specifice pentru A II; în probele biologice (plasmă, țesuturi) obișnuit sînt prezente și substanțele înrudite, care dau reacții încrucișate: decapeptidul A I, heptapeptide și hexapeptide (A III) din familia angiotensinelor. În plus, multe substanțe prezente în probele de cercetat conțin substanțe structural neînrudite care interferează în reacția A II—anticorp sau care leagă A II. Mai mult, A II radioiodurată poate conține substanțe înrudite cu A II și care reacționează încrucișat cu antiserul (19). Procedeele de extracție a plasmei, utilizate cu scopul unui spor de specificitate, duc la valori cifrice fals reduse. Numai sistemele RIA cu antiseruri cu înaltă specificitate pot evita sau diminua neplăcerile reacțiilor încrucișate (19).

Sensibilitatea este de 0,03 ng/ml.

Precizia intra- și interserii este similară sistemelor RIA pentru A I.

H. *Aplicațiile clinice* sînt similare cu cele ale A I.

6.2.3. RADIOIMUNOANALIZA ALDOSTERONEI

A. *Introducere.* Aldosterona este un steroid C21 cu GM de 360 daltoni (fig. II.6.4.). Secretată în zona glomerurală a CSR, aldosterona este implicată în homeostazia hidroelectrolitică. De aceea, determinarea concentrației sale în lichidele biologice este necesară pentru investigarea fiziopatologiei metabolismului electroliților în hipertensiune, stări edematoase etc.

B. *Metode de măsurare.* Concentrația redusă a aldosteronei în lichidele biologice generează dificultăți tehnice. În plasma persoanelor normale, concentrația aldosteronei este sub 0,1 ng/ml, în comparație cu cortizolul a cărui concentrație este mai mare cu trei ordine de mărime. Între steroizi, aldosterona este unică prin aceea că o fracțiune considerabilă, de aproximativ

Scanned with OKEN Scanner

10%, se elimină în urină sub formă de conjugat glucuronat hidrosolubil (24). După hidroliză, aldosterona este eliberată şi poate fi cantificată. Avantajul măsurării aldosteronei în urină este acela că concentraţia metabolitului aldosteronă-glucuronat este de ordinul a 10 μg în 24 de ore. Măsurarea aldosteronei se efectuează prin „metoda cu dublu derivat izotopic" (25).

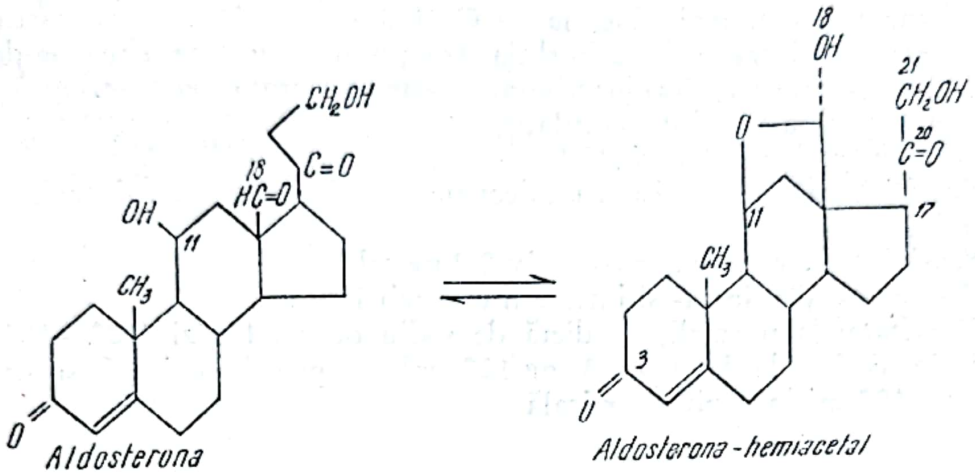


Fig. II.6.4. Formula chimică a aldosteronei: 11β,21-dihidroxi-4-pregnen-18 al-3,2-dion. În soluţie, grupul aldehidă de la C 18 trece într-o formă de mare stabilitate ca aldosteronă-hemiacetal (1, 23).

Prin metoda cu albastru de tetrazolium se poate măsura un alt metabolit al aldosteronei: tetrahidro-aldosteron-glucuronatul.

Obţinerea serurilor specifice anti-aldosteronă permite cantificarea acestui hormon în orice lichid sau ţesut biologic folosind sisteme RIA (1, 26, 27, 28, 29, 30).

C. *Sistem RIA*

Imunogenul: pentru obţinerea antiserurilor sînt folosite conjugate de aldosteronă-proteină ca de exemplu aldosteronă-18, 21-dihemisuccinat-albumină umană (31) sau conjugat aldosteronă-C21-albumină de iepure preparat prin condensarea aldosteronei C6-hemisuccinat.

Antiserul: capre sau iepuri injectaţi intradermic cu doze de 1—3 mg de conjugat aldosteronă-proteină produc antiseruri cu titrul de minimum 1:1 000, cu reacţii încrucişate cu steroizi C_{21}, C_{19} şi C_{18} cu totul neglijabile (31).

Aldosterona tritiată. Se foloseşte 1, 2, 6, 7—^{3}H-aldosterona livrată comercial în etanol la o concentraţie de aproximativ 1,2 μ Ci/ml. Activitatea specifică este de aproximativ 250 mCi/mg (90 Ci/mM); activitatea care se adaugă într-o probă este de aproximativ 6 nCi, care corespunde la 25 pg. Soluţia de ^{3}H-aldosteronă în etanol este stabilă o săptămînă la temperatura ambiantă şi aproximativ 4 luni la 4°C. După diluare în tamponul de lucru este stabilă numai 24 de ore la 4°C.

Standardul este aldosteronă cromatografic 98% pură, solubilizată în alcool absolut (foarte pur), la concentraţii de aproximativ 1 μg/ml. Se conservă în flacoane perfect etanş, la —20°C rămînînd stabilă timp de un an. Curba standard cuprinde concentraţii între 0,25 şi 10,0 ng/ml. După solubilizare în tamponul de lucru nu mai este stabilă decît 24 de ore la 4°C.

Probele biologice. Aldosterona se dozează în ser sau plasmă şi în urină după extracţie prealabilă cu diclormetan, urmată sau nu de repurificare cro-

matografică, în funcţie de gradul de precizie dorit. Extracţiile, ca şi dozările, se fac în eprubete de sticlă. Recuperarea în cursul procedeelor de extracţie se calculează monitorizînd procedurile cu o mică doză de ^{3}H-aldosteronă.

Condiţii de incubare şi tehnica de separare. Mediul de incubare este o soluţie tampon uzuală, de exemplu tampon Tris, la pH=7,4, cu lizozim şi EDTA. Incubarea reactivilor este scurtă: de exemplu 30 de minute la temperatura camerei sau, mai bine, la 37°C şi 2 ore la 0—2°. Separarea fracţiunii legate se obţine prin adsorbţia fracţiunii libere pe cărbune-dextran, urmată de centrifugare. Radioactivitatea este măsurată în fracţiunea legată la un contor beta cu lichid de scintilaţie.

Performanţele sistemului RIA

Specificitatea: cu antiseruri adecvate nu sînt detectate interferenţe cu alţi steroizi.

Sensibilitatea este de aproximativ 0,2 ng/ml.

Precizia: CV% intra- şi interserii este sub 15%.

Rezultate: la normali, cu dietă de sodiu de 3—4 g/zi (100—150 mEq) variază în limite de la 1 la 3 ng/100 ml în poziţie culcată şi cresc la 10—25 ng/100 ml în poziţie verticală.

BIBLIOGRAFIE

1. **Vecsei P. von** — Aldosteron-Radioimmunoassay, Enke Ferdinand, Verlag Buchhandlung, Stuttgart, 1975, 136 p.
2. **Page I. H., Bumpus F. M. (editori)** — „Angiotensin", Springer-Verlag, Berlin-New York, 1974.
3. **Modlinger R. S., Zadeh K. S., Ertel N. H., Gutkin M.** — J. clin. Endocr., 1976, *43*, 1 276.
4. **Catt K., Douglas J.** — În: „Nuclear Medicine in vitro" (editat de B. Rothfeld), Lippincott Co., J.B., Philadelphia-Toronto, 1974, p. 291.
5. **Tobian L., Tamboulian A., Hanacek J.** — J. Clin. Invest., 1959, *38*, 605.
6. **Skinner S. L., McCubbin J. W., Page J. H.** — Circ. Res., 1964, *15*, 64.
7. **Davis J. O.** — Amer. J. Med., 1973, *55*, 333.
8. **Vander A. J.** — Physiol. Rev., 1967, *47*, 359.
9. **Gann D., Della C., Gill J.** — Amer. J. Physiol., 1964, *207*, 104.
10. **Dluhy R., Axelrod L., Underwood R.** — J. Clin. Invest., 1972, *51*, 1 950
11. **Horton R.** — Metabolism, 1973, *22*, 1 525.
12. **Boucher R., Veyrat R., de Champlain J., Genest J.** — Canad. med. Ass. J., 1964, *90*, 194.
13. **Gunnels J. C. Jr., Grim C. E., Robinson R. R., Wildermann N. N.** — Arch. Intern. Med., 1967, *119*, 232.
14. **Paje I. H., Cubbin J. W. Mc** — Renal Hypertension, Publisher Inc. Year Book, Chicago, 1968.
15. **Hăulică I., Brănişteanu D., Roşca V., Stratone A., Berbeleu V., Vălan G., Ionescu L.** — Endocrinology, 1975, *96*, 508.
16. **Kotchen T. A., Flamenbaum W., Cirksena W., Gamble W.** — J. clin. endocr., 1973, *36*, 304.
17. **Haber E., Koerner T., Page L. B., Kliman B., Purnode A.** — J. clin. endocr., 1969, *29*, 1 349.
18. **Freedlender A. E., Fyhrquist F., Hollemans H. J. G.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay", (editat de B. M. Jaffe şi H. R. Behrman), Academic Press Inc., New York, 1974, p. 455.
19. **Goodfriend T. L.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York-Basel, 1977, p. 511.
20. **Day R. P., Leutscher J. A.** — J. clin. Endocr., 1974, *38*, 923.
21. **Sealey J. E., Laragh J. H.** — Circ. Res., *36—37*, 1975, Suppl. 1, 1, 10.
22. **Sambhi M. P., Eggena P., Barett J. D., Tuck M., Wiedeman C. E., Thananopavarn C.** — Circ. Res., *36—37*, 1975, Suppl. 1, 1, 28.

Scanned with OKEN Scanner

23. **Williams R. H.** — Textbook of Endocrinology, ed III, Saunders Company, W. B., Philadelphia, 1968.
24. **Berkowitz B. A., Spector S.** — Experientia (Basel), 1970, *26*, 982.
25. **Berkowitz B. A., Tarver J. H.** — J. Pharmacol. Exp. Ther., 1971, *177*, 119.
26. **Mayes D., Furuyama S., Kem D. C., Nugent C. A.** — J. clin. endocr., 1970, *30*, 682.
27. **Bayard F., Beitins I. Z., Kowarski A., Migeon C. J.** — J. clin. endocr., 1970, *31*, 1.
28. **Ito K., Woo J., Maning R., Horton R.** — J. clin. endocr., 1972, *34*, 106.
29. **Vetter W., Vetter H., Siegenhaler W.** — Acta Endocr., 1973, *74*, 548.
30. **Vetter W., Vetter H., Siegenhaler W.** — Acta Endocr., 1973, *74*, 558.
31. **Abraham G. E., Manlimos F. S.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York-Basel, 1977, p. 591.

Scanned with OKEN Scanner

7

HORMONI ŞI PROTEINE FETOPLACENTARE

7.1. INTRODUCERE

Unul din dezideratele majore ale medicinii este detectarea precoce a *suferinţei fetale* cu ajutorul unei metode simple, rapide şi necostisitoare. În ultimii ani, deşi au fost dezvoltate astfel de tehnici, ele sînt încă insuficient exploatate în practica medicală. Cu ajutorul unor astfel de tehnici se încearcă rezolvarea unui alt deziderat major al medicinii şi anume *detectarea precoce a proceselor neoplazice* şi *controlul terapiei anticanceroase.*

Fătul şi placenta sintetizează o serie de hormoni şi proteine care, în afara sarcinii lipsesc sau se află în concentraţii nesemnificative în lichidele biologice.

Unitatea fetoplacentară poate fi urmărită pe linia producerii estriolului: suprarenala şi ficatul fetal sintetizează 16α-hidroxidihidroepiandrosteron sulfatul, care este hidrolizat şi convertit la estriol de către placentă. Estriolul trece apoi în circulaţia maternă, este conjugat în ficatul mamei predominant la estriol-16-α-monoglucuronat şi apoi este excretat de rinichiul matern în urină.

Toate celelalte substanţe şi hormoni identificaţi pînă acum sînt sintetizate fie de făt, fie de placentă. Hormonii proteici, sintetizaţi mai ales de trofoblastul placentei sînt: HCG, HPL, analogi ai ACTH şi TSH şi în plus, diferite enzime ca oxitocinaza şi izoenzime ca fosfataza alcalină placentară, cistin-aminopeptidaza şi altele (1). Fătul sintetizează fetoproteine (FP) şi antigene carcinoembrionare (CEA).

Majoritatea testelor de laborator pentru controlul evoluţiei fătului sau a funcţiei placentare se bazează pe măsurarea în circulaţia sau în urina maternă a substanţelor produse de unitatea fetoplacentară (2).

Estriolul, fiind produs şi de făt şi de placentă, măsurarea sa are avantajul că permite supravegherea stării funcţionale a întregii unităţi materno-fetale. Totuşi, cu excepţia unor defecte genetice, disfuncţia placentei reprezintă sursa principală de ameninţare pentru făt, de aceea starea fătului poate fi sondată cu ajutorul unui test de investigare a placentei.

Scanned with OKEN Scanner

Au fost elaborate criterii de selecţie a unui test adecvat pentru funcţia placentei (2):

a) Substanţa care se măsoară să fie detectabilă numai în cursul sarcinii, contribuţia maternă limitîndu-se la *clearance* şi la excreţie. De exemplu, în cazul măsurării estrogenilor urinari, funcţia renală a mamei poate avea o influenţă considerabilă asupra rezultatelor.

b) Nivelul substanţei măsurate să nu prezinte variaţii grosolane nici în cursul unei zile şi nici de la o zi la alta.

c) Timpul de înjumătăţire (semiviaţa) al substanţei măsurate să fie suficient de scurt, astfel încît intervalul de timp între prăbuşirea sintezei şi scăderea nivelului periferic să fie de asemenea scurt.

d) Tehnica de măsurare a substanţei folosită ca indicator să fie precisă, aplicabilă unui număr mare de probe biologice şi să fie rapidă, astfel încît rezultatele să poată fi transmise clinicianului la intervale de ore (nu de zile).

7.2. GONADOTROFINA CORIONICĂ UMANĂ (HCG)

7.2.1. FIZIOLOGIE

Gonadotrofina corionică umană (HCG = Human Chorionic Gonadotropin) este o glicoproteină sintetizată predominant de sinciţiotrofoblast şi în mai mică măsură de citotrofoblast. Nu este detectabilă în serul sau în urina persoanelor normale în afara sarcinii. Totuşi, mici cantităţi de HCG-similar au fost detectate în testicul (3) şi în hipofiză (4). Se întrevede ca tehnici încă mai sensibile să poată detecta HCG sub sensibilitatea actuală de 10 pg/ml (0,2 mU/ml) cu ser anti-HCG intact (1, 5).

HCG trece din sînge în urină cu rata de clearance de 1,0—1,5 ml/minut, de aceea concentraţia HCG este similară în plasmă şi în urină la un flux urinar mediu de 1,0—1,5 ml/ minut (1).

HCG este alcătuită din două subunităţi legate necovalent. Subunitatea α, cu GM=14 900, este similară, ca secvenţă a aminoacizilor cu subunitatea α a LH, FSH şi TSH. Subunitatea β, cu GM=23 000 seamănă cu aceiaşi hormoni hipofizari, dar lanţul proteic se prelungeşte la capul C-terminal cu încă 30 de reziduuri de aminoacizi comparativ cu LH. Această secvenţă suplimentară are un conţinut mare de reziduuri de prolină şi serină. Ambele subunităţi au un conţinut crescut în acid sialic (1, 5).

Majoritatea serurilor anti-HCG intact reacţionează încrucişat cu LH, dar unele seruri anti-HCG-β permit o bună discriminare, ele detectînd concentraţii de HCG de 50—100 de ori mai mici decît pentru LH. Dozările cu ser anti-HCG intact sînt dozări HCG/LH, pe cînd cele cu ser anti-HCG-β detectează HCG la concentraţii sub 1 mU/ml, fără ca LH să interfereze în dozare (1, 5, 6). Sistemele RIA pentru HCG-β măsoară şi HCG intact şi HCG-β liber, la persoane normale, în afara sarcinii, observîndu-se valori sub 1 mU/ml (1, 5).

HCG este secretată de placenta umană în tot cursul sarcinii, creşterea valorilor serice putînd fi detectată prin metoda RIA începînd cu intervalul în care trebuie să vină prima menstră, deci la aproximativ 10—20 de zile de la fecundare (7).

Rolul fiziologic al HCG în sarcină este insuficient clarificat, în bună parte datorită dificultăţilor create de similitudinea structurală cu LH. Se

Scanned with OKEN Scanner

pare că HCG are un rol în menţinerea nivelului estrogenilor şi al progesteronei pînă cînd steroidogeneza placentară a atins un nivel satisfăcător. Nu sînt excluse nici eventuale intervenţii în relaţiile imunologice mamă-făt în perioada iniţială a sarcinii (fig. II.7.1).

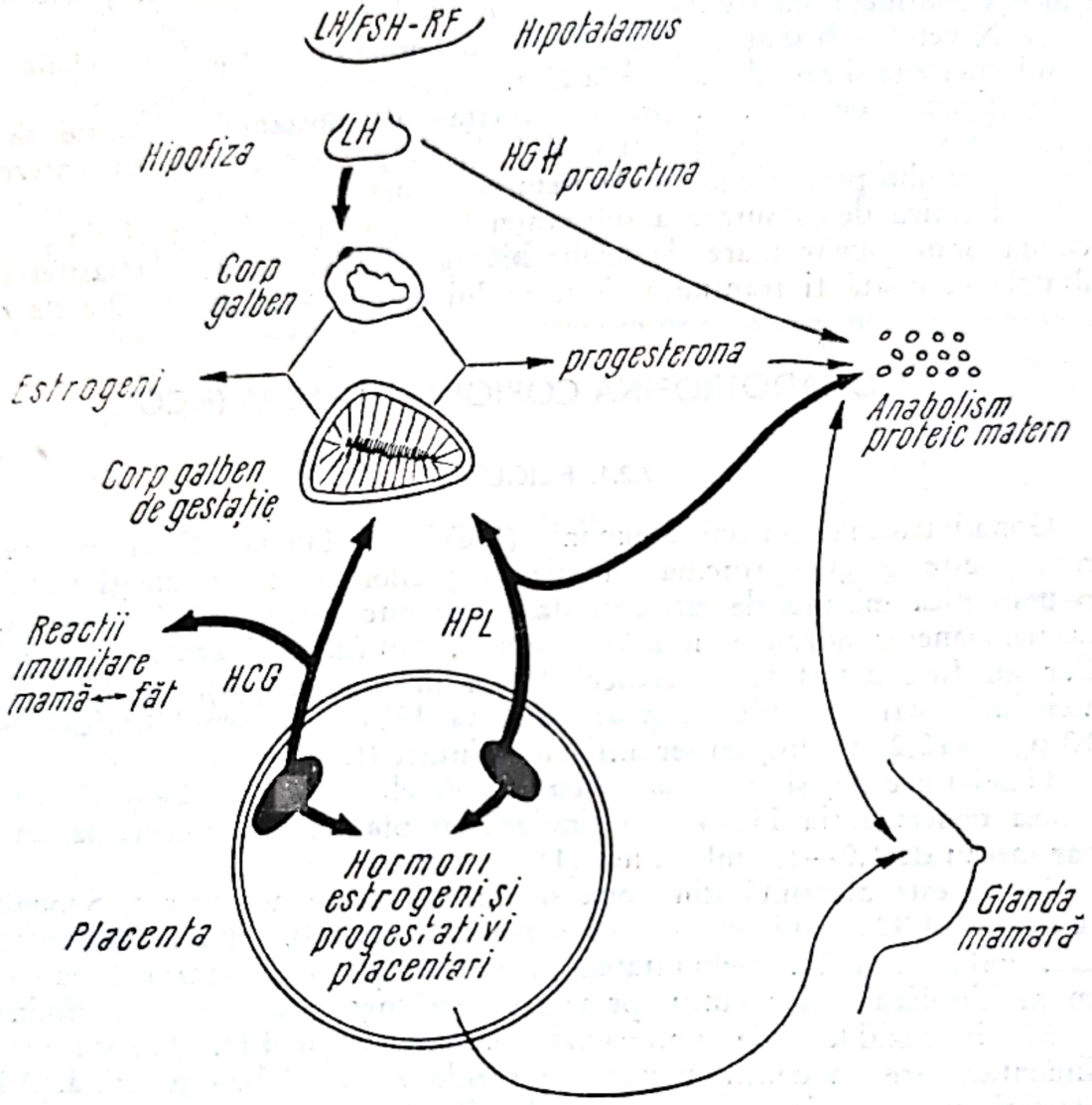


Fig. II.7.1. Reprezentare schematică a mecanismelor de reglare şi a rolului fiziologic al HCG şi HPL (după referinţa 8).

Creşterea HCG în ser se face lent în primele 30—40 de zile de la ultima menstră normală, apoi creşte brusc atingînd 3—5 U/ml la 50 de zile, adică la trei săptămîni după ultima menstră absentă (7). La asemenea concentraţii, metoda RIA nu mai este absolut necesară, putînd fi înlocuită cu metodele imunochimice, aplicate la probe de urină. Valorile obţinute prezintă unele variaţii, în funcţie de metodă şi de preparatul standard folosit.

7.2.2. METODE DE DETECTARE ŞI MĂSURARE

Metodele biologice folosite pentru detectarea şi măsurarea HCG în extractele de urină sînt aceleaşi ca cele folosite pentru LH (vezi 2.4.2).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru diagnosticarea sarcinii sînt folosite metode biologice (tehnica Galli-Mainini) şi metode imunochimice rapide.

7.2.3. RIA PENTRU HCG/LH

A. *Imunogenul.* Preparatele comerciale de HCG semipurificat se dizolvă în ser fiziologic la o concentraţie de 2 500 U/ml, se emulsionează într-un volum egal de adjuvant şi se injectează intradermic la iepure. Injecţiile se repetă pînă se obţine un titru convenabil.

B. *Antiserul.* Diluţia iniţială a antiserului folosit în RIA este de 1:10 000—1:50 000. Majoritatea serurilor anti-HCG reacţionează încrucişat cu h-LH.

C. *^{125}I—HCG.* HCG foarte purificat, de exemplu cu activitate specifică de 20 000 U/mg este marcat cu ^{125}I prin metoda cu cloramina-T. Se obţin activităţi specifice de 30—60 μCi/μg folosind 1 mCi ^{125}I pentru 2,5 μg HCG.

Purificarea se face pe coloană de Sephadex G-50. Verificarea purităţii în exces de antiser dă imunoreactivitate specifică de 90—95%. ^{125}I—HCG nu se absoarbe bine la origine în radiocromatoelectroforeză şi nici nu se adsoarbe bine pe cărbune (9).

D. *Preparatul standard.* Se foloseşte al doilea Standard Internaţional pentru HCG (IS—HCG), oferit de OMS prin Division of Biological Standards, National Institute for Medical Research, Londra. În cazuri de coriocarcinom, HCG se poate cantifica şi în termeni de h-LH (9), folosind al doilea IRP—HMG (din aceeaşi sursă ca II—IRP—HCG) sau LER—907 oferit de NIAMDD, Bethesda, Maryland, SUA.

E. *Probele biologice.* Pentru *sînge*, nu sînt necesare pregătiri speciale ale pacientei sau ale probelor. 10 ml *urină* sau 5—8 ml de sînge se trimit la laborator; buletinul de însoţire conţine datele uzuale ale pacientei şi, în plus, data ultimei menstre, în cazul femeilor cu probleme legate de sarcină, volumul urinii şi data extirpării tumorii trofoblastice, cînd este cazul.

HCG este un hormon relativ stabil, care se menţine intact în urina cu conservant timp de 48—72 de ore la temperatura camerei.

F. *Condiţiile de incubare şi tehnica de separare.* Mediul de incubare conţine sisteme tampon uzuale, la pH=7,5—7,8. Sînt preferate incubări la rece, dar se obţin rezultate convenabile şi cu incubare la temperatura ambiantă.

Tehnica de separare uzuală este cu dublu anticorp, folosind al doilea anticorp ca atare sau adsorbit pe un suport solid.

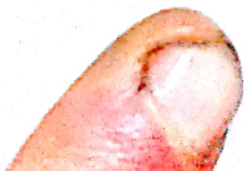
G. *Performanţele sistemului RIA*

Specificitate: în sistem interferează h—LH.

Sensibilitatea: limita de detectare a sistemului este de 20 mU/ml (2 mU/eprubetă la un volum total de incubare de 1,0 ml).

Exactitatea: diluţii seriate din serul şi urina femeilor gravide şi din serul pacientelor cu coriocarcinom dau curbe paralele cu IS—HCG.

Precizia: coeficientul de variabilitate intraserie este de 5—8%, iar interserii de 10—15%.



Scanned with OKEN Scanner

7.2.4. β-HCG

A. *Introducere.* S-a observat că tumorile care produc HCG intact produc în exces, fie subunitatea α, fie subunitatea beta (β10). Unele tumori produc numai subunitatea μ-HCG iar altele numai β-HCG (11). În unele cazuri, cantitatea de subunităţi detectată este suficient de mare pentru a servi ca mijloc de control al evoluţiei şi influenţei terapeutice. Semnificaţia sintezei HCG şi a subunităţilor sale în celulele unei varietăţi de tumori este încă în studiu; se susţine că tehnica cu imunoperoxidază evidenţiază HCG, HPL sau alte peptide placentare pe suprafaţa acestor tumori productive (11, 12).

B. *Sistem RIA pentru β-HCG.* Subunitatea β-HCG este folosită ca imunogen şi pentru prepararea trasorului. Preparatul standard este al doilea IS—HCG.

Pentru aprecierea exactităţii sistemului sînt necesare teste de paralelism folosind fie ^{125}I-β-HCG, fie ^{125}I-HCG intact (9).

7.2.5. APLICAŢII CLINICE ŞI REZULTATE

A. *Indicaţii clinice ale dozării HCG intact*

În avortul incomplet, în iminenţa de avort şi în sarcina ectopică, nivelul HCG seric este inferior celui observat în stadiul corespunzător al sarcinii normale. Valoarea obţinută pentru HCG nu poate fi confundată cu valoarea LH, deoarece concentraţia este mai mare decît a LH în momentul ovulaţiei.

— *În mola hidatiformă,* concentraţia HCG este foarte crescută; dozarea se repetă la 3 săptămîni după evacuarea uterului şi apoi din 2 în 2 săptămîni, pînă ce scade. Se continuă controlul lunar timp de 12 luni după operaţie şi apoi din 3 în 3 luni timp de încă 12 luni. Pacientele care au avut molă şi rămîn gravide sînt controlate încă din primele 3 săptămîni de sarcină (13).

— *În coriocarcinom* sau alte tumori trofoblastice, determinarea HCG se face prin RIA pentru a diagnostica coriocarcinomul postsarcină, indiferent de felul sarcinii sau pe cel din gonade (ovar sau testicul). Măsurarea HCG este indicată pre- şi postorhiectomie în orice formă de teratom testicular.

— RIA—HCG este indicată şi în *supravegherea evoluţiei tumorilor trofoblastice* sub influenţa terapiei.

În cazul tumorilor secretante de HCG, este indicat ca dozarea să se facă cu sistem RIA- - HCG.

B. *Rezultate*

Concentraţia HCG seric observată în cursul sarcinii normale este crescută în primul trimestru, scade în trimestrul al doilea şi creşte din nou în ultimul trimestru (8, 14), spre deosebire de HPL, care creşte în tot cursul sarcinii (fig. II.7.2.).

C. *Aspecte clinice ale dozării β-HCG*

Sistemul RIA-β-HCG este mai specific decît sistemul RIA—HCG intact, deoarece reacţia încrucişată cu LH este mult diminuată. Sistemul β-HCG prinde şi HCG intact şi subunitatea β-HCG liberă şi este de preferat pentru dozarea HCG în ser, şi în LCR, dar dozarea se poate face şi în urină.

Scanned with OKEN Scanner

La normali, în afara sarcinii, concentrația β-HCG plasmatică este echivalentă cu 5 mU HCG/ml sau mai mică. Valori peste 10 mU/ml au semnificație patologică.

Pregătirea pacientului și a probelor biologice

Nu sînt necesare pregătiri speciale la recoltarea sîngelui și a urinii. În cazul recoltării LCR sînt necesare precauțiile menționate la gonadotrofinele hipofizare.

Se recoltează 3—5 ml de plasmă pe EDTA (2 mg/ml sînge) ca anticoagulant. LCR se recoltează în volum de 2—5 ml. Buletinul de însoțire trebuie să conțină datele exacte deoarece valorile întîlnite variază în limite distanțate cu 7 ordine de mărime, ceea ce creează dificultăți la încadrarea în curba standard a valorilor din probele insuficient diluate. În același scop, se menționează și rezultatul unor determinări anterioare.

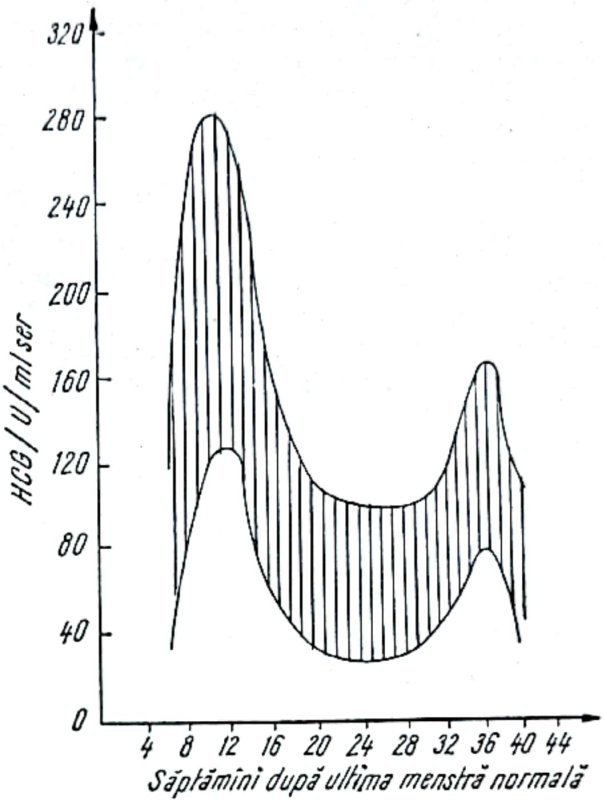


Fig. II.7.2. Concentrația HCG în ser în cursul sarcinii normale (după referința 15).

Indicații ale dozării HCG seric în sistem β-HCG:

— pentru detectarea coriocarcinoamelor minime reziduale, se poate doza simultan și alfa-fetoproteina;

— înainte și după gonadectomie pentru teratom (se poate doza simultan și alfa-fetoproteina);

— în suspiciunea de coriocarcinom cu valori echivoce sau negative ale HCG în urină;

— în timpul și după chimioterapia pentru coriocarcinom;

— pentru detectarea metastazelor cerebrale se fac dozări simultane în plasmă și în LCR; în absența metastazei raportul plasmă / LCR al β-HCG sau al HCG este peste 60/1 cu raport mediu de 280/1. Valori ale raportului sub 60/1 sugerează prezența intracerebrală a țesutului tumoral secretor de HCG (5).

7.3. LACTOGENUL PLACENTAR

7.3.1. NOMENCLATURĂ

Lactogen placentar uman este denumirea atribuită proteinei placentare cu proprietăți lactogene (semnalată încă de prin anul 1930) odată cu descoperirea înrudirii antigenice cu hormonul de creștere uman (16, 17). Ulterior, lactogenul placentar uman a primit și alte nume ca: „hormon de creș-

tere — prolactină corionică umană" (CGP), „proteină placentară purificată" (PPP) şi „somatomamotrofină corionică umană" (HCS). Discuţiile asupra „denumirii" au durat cîţiva ani (18, 19) dar a rămas stabilit că tot denumirea iniţială de lactogen placentar uman (HPL) este cea mai potrivită (19).

Tehnica de dozare radioimunologică (20) deschide calea folosirii acestei substanţe ca indicator al evoluţiei fătului în cursul sarcinii.

Detectarea prin RIA, a HPL în ţesutul testicular normal (21) pune unele probleme în legătură cu specificitatea de organ a acestei proteine.

7.3.2. FIZIOLOGIE

HPL este o proteină cu greutate moleculară de aproximativ 20 000 daltoni, care prezintă asemănări structurale importante cu HGH (22, 23, 24, 25, 26) dar şi cu prolactina ovină (26). HPL este sintetizat de sinciţiotrofoblaştii placentei (27) şi poate fi detectat de la începutul sarcinii. În ultimul trimestru al sarcinii rata producţiei HPL este de aproximativ 1 gram pe zi (27), mult mai mare decît a oricărui alt hormon polipeptidic. Semiviaţa HPL este de 10—20 de minute.

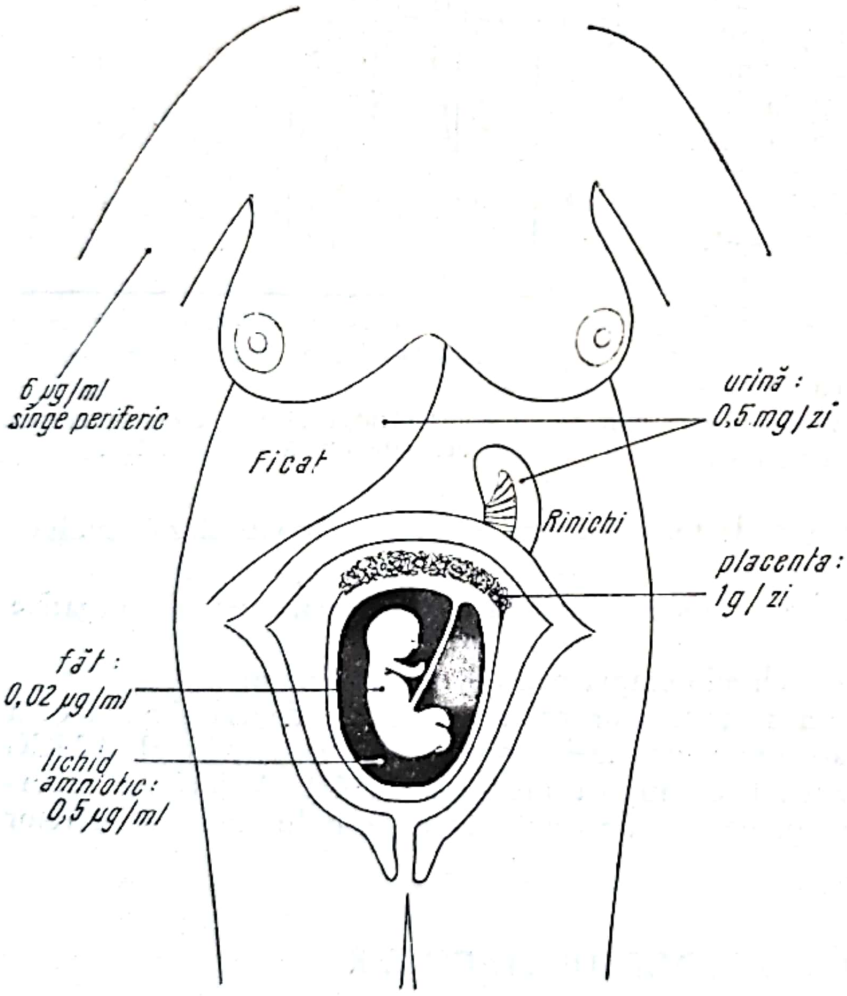


Fig. II.7.3. Sinteza şi distribuţia HPL în ultimul trimestru al sarcinii (după referinţa 2).

HPL este secretat în special în circulaţia maternă; la făt, nivelul este cu două ordine de mărime mai mic, iar în lichidul amniotic este cu un ordin de mărime sub concentraţia din sîngele mamei (28). Metabolizarea HPL are loc în ficat şi în rinichi; numai o mică parte este excretată în urină (fig. II. 7.3). Funcţiile fiziologice ale HPL sînt practic necunoscute (2): acţiunea asupra creşterii somatice este minimă, iar efectele mamotrope şi lactogene sînt mai reduse decît ale prolactinei hipofizare. S-a sugerat că HPL ar fi răspunzător de unele din modificările fiziologice materne în cursul sarcinii, influenţa sa exercitîndu-se în special asupra metabolismului glucozei, lipidelor şi azotului (29, 30). Deoarece în serul mamelor diabetice au fost găsite concentraţii peste limita

Scanned with OKEN Scanner

superioară a normalului, se presupune că HPL ar putea fi factorul diabetogen major în cursul sarcinii; totuși, atît estrogenii cît și progesterona ar putea avea efecte similare.

Sinteza și secreția HPL par să fie autonome, ca în tumori. Dacă este așa, atunci nivelul circulant al HPL ar reflecta în primul rînd masa funcțională a placentei și tocmai această relație cu masa placentară justifică măsurarea sa ca indicator al evoluției sarcinii (28).

Estimarea concentrației HPL se face după toate criteriile unui test adecvat al funcției placentare (2). La unele femei pot apărea fluctuații de la o zi la alta, dar mult mai reduse decît cele ale estriolului urinar (2).

În cazul HPL, metodele biologice nu pot fi folosite deoarece, așa cum s-a menționat mai sus, acestei substanțe nu i s-a decelat o activitate biologică precisă.

În ultimele două trimestre de sarcină, valorile circulante sînt suficient de crescute pentru ca HPL să poată fi detectată și cu metode imunochimice; totuși, metoda de elecție pentru cantificarea HPL este cea radioimunologică.

7.3.3. SISTEM RIA PENTRU HPL

Sisteme RIA pentru măsurarea HPL în lichidele și țesuturile biologice au fost descrise de multe laboratoare (31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45).

A. *Imunogenul.* Sînt folosite preparate foarte purificate de HPL obținute din placente la termen (46) sau HPL cu puritate de peste 95% oferit de NIAMDD—NIH (SUA), HPL în cantitate de 1—2 mg/doză, dizolvat în bicarbonat de sodiu 0,5 M și emulsionat în adjuvant se comportă ca un bun imunogen.

B. *Antiserul.* Iepurele sau cobaiul imunizați cu HPL produce anticorpi cu titruri inițiale de 1 : 1 000—1 : 10 000. Antiserul nu reacționează încrucișat cu HCG sau cu TSH. Reacția încrucișată pe care o dă cu HGH nu intervine în sistem, ținînd seama că nivelul fiziologic al HPL este cu trei ordine de mărime superior concentrației HGH. Ca și HPL pur, și antiserul poate fi obținut de la NIAMDD—NIH.

C. *HPL marcat.* HPL dizolvat în bicarbonat de sodiu 0,5 M este marcat cu ^{125}I prin metoda cu cloramina-T. Purificarea se face pe coloană de Sephadex G—50 sau G—75. ^{125}I—HPL nealterat eluează pe partea descendentă a primului pisc, imediat după eluatul cu radioactivitate maximă. Se preferă activitatea specifică nu peste 50 μCi/μg. Congelat, rămîne stabil 4—5 săptămîni, cu conservarea imunoreactivității la un procent de peste 80%.

D. *HPL Standard.* Nu există încă un preparat standard internațional. Preparatul de HPL foarte purificat oferit de NIAMDD—NIH poate servi ca preparat de referință. Exprimarea rezultatelor se face în termeni de masă; o indicație utilă este aceea că absorbția în ultraviolet (densitatea optică la 280 mm) pentru 1 mg/ml de preparat de HPL foarte pur este de 0,86 (45). Soluția mamă poate conține 1,0 μg/ml în tamponul de lucru și se conservă prin congelare timp de aproximativ 15 luni (45). Curba standard se construiește cu concentrații progresive de hormon între 0,2 și 10 ng/ml.

E. *Probele biologice.* Concentrația HPL nu prezintă variații circadiene și nici nu este influențată de alimentație, de postură sau de efort, de

Scanned with OKEN Scanner

aceea probele de sînge pot fi recoltate la orice oră şi în orice condiţii. Dacă laboratorul are o siguranţă adecvată a limitelor normalităţii, atunci o singură probă poate fi suficientă întrucît interpretarea se poate face statistic. Dacă aceste limite nu sînt bine stabilite, atunci sînt necesare prize seriate de sînge la intervale dictate de starea clinică, avînd ca scop să se poată surprinde eventuale prăbuşiri ale nivelului HPL.

Proba de sînge, cu volum de 2—3 ml, este trimisă celui mai apropiat laborator. Întrucît rezultatul trebuie comunicat în răstimp de ore, centrul sau laboratorul RIA trebuie să fie situat cît mai aproape de unitatea care solicită şi să fie dotat pentru prelucrarea rapidă a probelor. Buletinul de însoţire conţine, în afara datelor uzuale, diagnosticul de prezumţie şi stadiul sarcinii.

F. *Condiţii de incubare şi tehnica de separare.* Mediul de incubare este unul din sistemele tampon uzuale. Temperatura de incubare este funcţie de rapiditatea cu care trebuie eliberat rezultatul. Sînt folosite incubări scurte la 37°C sau incubări mai lungi la 4°C. Poate fi aplicată orice tehnică de separare a HPL liber de cel legat de anticorp.

7.3.4. ASPECTE CLINICE ALE MĂSURĂRII HPL

A. *Indicaţii ale dozării HPL.* Determinarea concentraţiei HPL în sîngele matern este un indicator util al stării fătului în majoritatea cazurilor cu anomalii ale sarcinii. Pentru aceasta însă fiecare laborator este obligat să stabilească limitele normalităţii pentru populaţia pe care o investighează, pe un număr suficient de mare de sarcini cu evoluţie normală. Această măsură este necesară, deoarece există diferenţe numerice de la un centru RIA la altul şi în plus, „normalitatea" este diferită pentru diferitele populaţii (2).

Principalele indicaţii clinice ale măsurării HPL sînt: iminenţa de avort, avortul incomplet, preeclampsia şi hipertensiunea de sarcină, întîrzierea creşterii intrauterine a fătului, eritroblastoza (izoimunizarea Rhesus), diabetul zaharat, tumorile trofoblastice, moartea fetală şi asfixia neonatală.

Tabelul II.7.1.

Nivelul seric al HCG şi HPL în cursul sarcinii normale

Intervalul de timp	HCG U/ml (valori medii)	Preparat standard	Referinţa
Trim. I II III la termen	163 12 63	II IRP-HMG	(7)
	HPL μg/ml (limite		
Trim. I II III La termen	0,2—0,3 2—4 4,5—8 6—7 (variază după autori şi după standardul folosit, în limite de la 1,5 la 25)	NIAMDD-NIH HPL şi alte preparate de referinţă	(30) (47)
În travaliu	5—5,5		

Scanned with OKEN Scanner

B. *Rezultate*

Sarcina normală. Limitele normale se definesc ca medie şi deviaţie standard. Limitele de variaţie în interiorul unei populaţii selecţionată pe baze geografice sau sociale sînt largi. Frecvent, între limita inferioară şi cea

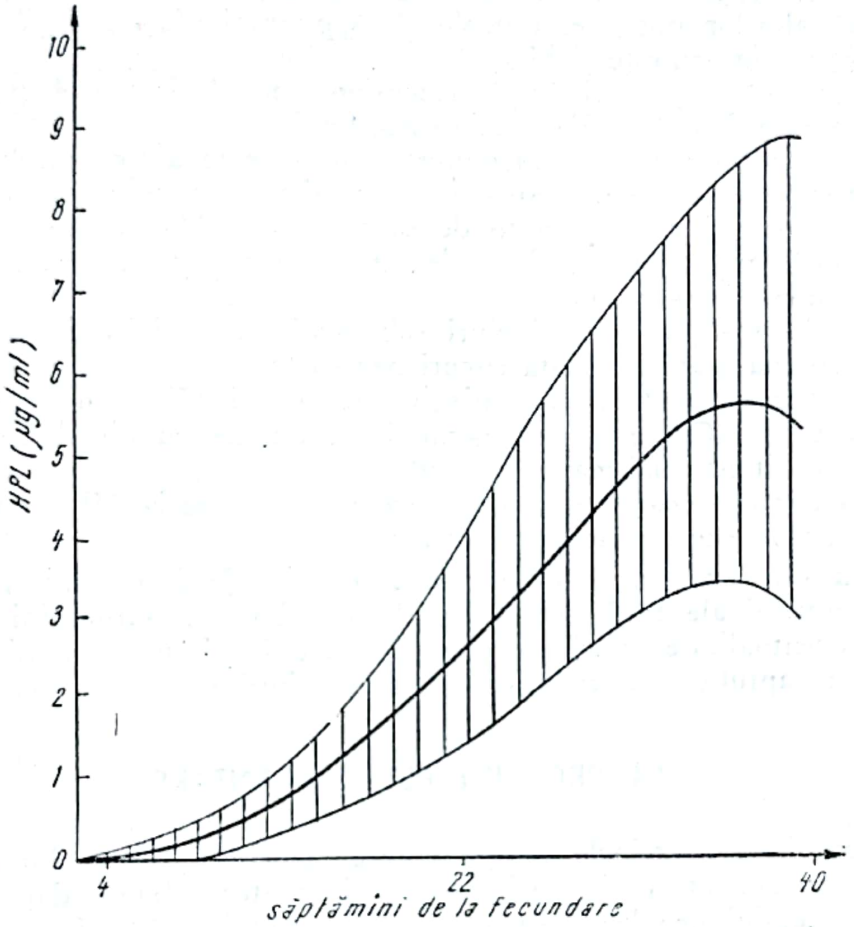


Fig. II.7.4. Limitele concentraţiei HPL în ser în cursul sarcinii normale. Linia plină reprezintă media şi zona haşurată plus şi minus două deviaţii standard (referinţa 2).

superioară a concentraţiilor HPL, într-o anumită etapă a sarcinii, sînt diferenţe procentuale şi multiplicative (tabelul II.7.1.).

Cu ajutorul tehnicii RIA pot fi detectate niveluri de ordinul zecilor de nanograme începînd din săptămîna a 4-a după fecundare. Concentraţia HPL seric atinge valori de ordinul microgramelor între săptămîna 12 şi 16 de la fecundare. Nivelul seric creşte progresiv şi în ultima lună se observă un platou (fig. II.7.4.).

Interpretarea valorilor HPL anormale. Clinicianul aşteaptă un răspuns categoric, dar în cazul HPL adesea acest răspuns este aproape imposibil de elaborat deoarece există suprapuneri între valorile normale şi cele patologice. De exemplu, în sarcina cu făt normal dar subponderal se pot înregistra concentraţii ale HPL similare cu cele din sarcina cu făt suprapondera dar cu placenta afectată. De aceea, rezultatul măsurării HPL trebuie interpretat pe baze statistice şi coroborat cu alţi parametri hormonali sau

Scanned with OKEN Scanner

biochimici. În ceea ce privește riscul pentru făt, acesta este minim cînd valorile HPL sînt peste media normalului. Cînd valorile HPL sînt sub medie, riscul crește progresiv și devine amenințare cînd concentrația HPL este sub limita inferioară a valorilor normale.

a) *În avort*, niveluri ale HPL care sînt cu peste două deviații standard sub media valorilor normale, dincolo de săptămînile 6—8 după fecundare, sugerează că sarcina nu este viabilă.

b) În *preeclampsie* și în *hipertensiune*, niveluri sub 4 μg/ml după săptămîna a 32-a de la fecundare indică risc fetal.

c) *În întîrzierea creșterii intrauterine*, în absența altor complicații, niveluri cu peste două deviații standard sub media normalului arată risc fetal.

d) În *eritroblastoză*, înainte de săptămîna a 24-a de la fecundare, o valoare a HPL mai mare de două deviații standard peste media normalului arată că fătul este în suferință.

e) În *diabetul zaharat*, niveluri sub media normalului în trimestrul al III-lea de sarcină arată că există riscuri pentru făt.

f) În *tumori trofoblastice*, nivelul scăzut al HPL în prezența unui nivel crescut al HCG este patognomonic și anume cu cît discrepanța este mai mare, cu atît este mai mare și gradul de malignitate.

g) *În caz de moarte a fătului*, deseori concentrația HPL poate fi scăzută sau se prăbușește înainte de moartea acestuia.

h) *În suferința fetală și asfixia neonatală*, dacă nu sînt alte complicații, concentrații ale HPL sub 4 μg/ml în ultimele 5 săptămîni de sarcină sugerează eventualitatea unei complicații fetale în timpul travaliului sau al expulziei sau faptul că creșterea fătului este încetinită (2).

7.4. PROTEINE FETOPLACENTARE

Hormonii și proteinele fetoplacentare (tabelul II.7.2.) sînt considerate nu numai ca indicatori ai stării funcționale materno-fetale dar și ca marcheri ai procesului neoplazic, ca și hormonii ectopici (48). De aceea, detectarea acestor substanțe la persoane aparent normale, în afara sarcinii, cu ajutorul unor metode sensibile, precise și de mare randament, pare să fie o cale promițătoare pentru diagnosticul cancerului la om.

7.4.1. ALFA-FETOPROTEINA (AFP)

A. *Considerații generale.* Alfa-fetoproteina (AFP) umană are greutate moleculară de aproximativ 70 000 daltoni, conține 4% hidrați de carbon și două reziduuri de acid sialic per moleculă. Electroforetic, AFP fetală migrează cu alfa-globulinele ca o singură componentă, spre deosebire de AFP din serul bolnavelor cu hepatom care are mai multe componente (49). Preparatele de AFP sînt persistent contaminate cu albumină (1).

Primele tehnici de cantificare ale AFP au fost imunodifuzia și contraelectroforeza. Tehnicile RIA sînt mult mai sensibile (50, 51, 52, 53) și sînt susceptibile de automatizare (2).

B. *Pregătirea pacientului și a probelor biologice*

Prizele de sînge sau de lichid amniotic pot fi luate în orice moment al zilei, fără vreo pregătire specială.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.7.2.

Hormoni şi proteine de origine fetoplacentară cu implicaţii în procesele tumorale

Substanţa	Locul sintezei	Nivelul seric la normali în afara sarcinii	Prezenţa în lichidele biologice ale bolnavilor cu procese neoplazice		Tipul de tumoare
			ser	ser/LCR	
HCG totală HCG subunităţi	Sinciţio-trofoblaşti (dominant) şi citoblaşti	nu	f. crescut dar variabil ex. 300 U/ml	>60/1: metastaze absente <60/1 sau raport inversat: metastaze	mola hidatiformă tumori trofoblastice teratomul malign
HPL	sinciţiotrofoblast	nu	scade		tumori trofoblastice
fetoproteine (AFP)	ficat făt	2—15 μg/l	10^4 μg/l		hepatom
β-FP	scinciţiotrofoblast	nu	prezentă la 11% din bolnavii cu cancer		neoplazii diferite
γ-FP	ţesuturi făt normal				
antigenul carcinoembrionar (CEA)	ţesuturile fetale	3—5 ng/ml	5 ng/ml		cancer de colon ş.a.
— antigenul fetal sulfoglicoproteic — antigenul fetal heterofil — fosfataza alcalină carcinoplacentară ş.a.					

În cazul prelevării lichidului amniotic, acesta trebuie însoţit şi de o probă de sînge matern, recoltată *înainte* de amniocenteză, deoarece după amniocenteză, uneori valorile AFP sanguin cresc. Dacă lichidul amniotic este sanguinolent, înseamnă că a fost contaminat cu sînge fetal şi se trimite la laborator necentrifugat (13).

Probele de ser şi de lichid amniotic, în volum de 2—3 ml se trimit la laborator; pe buletinul de însoţire se consemnează diagnosticul de prezumţie; în cazul gravidelor se notează stadiul sarcinii, iar în cazul tumorilor se menţionează dacă sîngele a fost recoltat pre- sau postoperator.

C. *Indicaţiile clinice ale dozării AFP*

Iniţial, măsurarea concentraţiei AFP în *ser* a fost folosită pentru detectarea anumitor procese neoplazice (52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59,) sau pentru urmărirea evoluţiei tumorii sub influenţa chimioterapiei (59). Ulterior, AFP a fost urmărită în *lichidul* amniotic şi în *serul matern* ca un auxiliar în diagnosticul defectelor tubului neural.

La adultul normal concentraţia AFP seric de 2—15 ng/ml.

Scanned with OKEN Scanner

a) *AFP în diagnosticul de boală canceroasă*

— În *carcinomul hepatocelular* şi *hepatoblastom*. Peste 80% din bolnavii cu carcinom hepatocelular au AFP crescută (55), observîndu-se concentraţii de ordinul 10^4 ng/ml. Nu există o corelaţie clară între concentraţia AFP şi mărimea sau gradul de diferenţiere al tumorii, ci cel mult cu masa tumorală viabilă (1, 5, 52). Cu toate acestea, practic nu există suprapuneri cu intervalul valorilor fiziologice; în alte condiţii, exceptînd hepatoblastomul sau teratomul, de exemplu în stările de regenerare hepatică, suprapunerea este redusă. Concentraţii crescute se observă şi în hepatoblastom, situaţie în care urmărirea variaţiilor serice ale AFP este utilă pentru supravegherea terapiei (60).

— *În teratom* (teratocarcinom), determinarea simultană a AFP şi a HCG — subunitatea β — este indicată la toţi bolnavii cu tumefiere a testiculului înainte şi după gonadectomie. Este utilă de asemenea în toate cazurile suspectate de tumoare, precum şi pentru detectarea recidivelor sau a ţesutului restant la cei operaţi de teratom malign.

— Niveluri persistent crescute ale AFP mai pot fi observate *în multe alte carcinoame:* de esofag, stomac, colon, rect şi mai rar de plămîn, sîn, prostată sau ovar.

b) *AFP în supravegherea tratamentului antitumoral*

În tratamentul *chirurgical*, valoarea măsurării AFP circulant se bazează pe cunoaşterea timpului de înjumătăţire al AFP, care este de 5—9 zile. De aceea, o determinare înainte de operaţie şi repetarea ei după aproximativ două săptămîni poate fi un indicator al reuşitei extirpării.

Eficienţa *chimioterapei* se poate obiectiva prin scăderea concentraţiei serice a AFP, pe cînd în cazurile de nereuşită, AFP creşte progresiv (60).

c) *AFP în bolile hepatice necanceroase*

Procesul de regenerare hepatică se asociază adesea cu sinteza şi eliberarea crescută dar tranzitorie a AFP. Concentraţia crescută a AFP seric, de exemplu de ordinul a 10^3 ng/ml, sugerează un prognostic favorabil în orice formă de insuficienţă hepatică acută în special la copii. În ciroza hepatică, în ataxia cu telangiectazie şi în serul copiilor cu atrezie biliară congenitală, se pot observa concentraţii crescute ale AFP, uneori peste 10^2ng/ml.

d) *AFP în obstetrică*

— *În sarcina normală*, concentraţia AFP în *serul fetal* atinge un maximum de aproximativ 1 000 μg/ml, între săptămîna a 20-a şi a 23-a de gestaţie; după aceea scade, şi la naştere este de ordinul a 100 μg/ml.

La *femeia gravidă*, concentraţia AFP în *ser* creşte de la 10 ng/ml în primul trimestru pînă la un maximum de aproximativ 200—500 ng/ml în săptămînile a 28-a şi a 36-a de gestaţie (61).

Aceste valori ale concentraţiei AFP în sarcina normală sînt orientative întrucît limitele normalităţii pentru serul matern şi pentru lichidul amniotic în raport cu vîrsta sarcinii nu sînt stabilite încă.

În *lichidul amniotic*, concentraţia AFP este de aproximativ 50 μg/ml.

— În cazurile de *suferinţă fetală* se poate observa deseori scăderea bruscă a concentraţiei AFP în serul matern.

— În *defecte fetale ale tubului neural* ca spina bifida şi anencefalie, concentraţia AFP creşte şi în serul matern şi diagnosticul se poate stabili mai bine între săptămînile a 14-a — a 18-a ale gestaţiei.

Scanned with OKEN Scanner

Concentrații crescute ale AFP în *lichidul amniotic* și în *serul mamei* pot fi observate și în alte anomalii congenitale, în cazurile de moarte fetală, în sarcina multiplă sau cînd mama are o boală hepatică.

— În *mola hidatiformă* și în *coriocarcinom*, nivelul seric al AFP este în limitele observate la normali în afara sarcinii, cu excepția cazului în care fătul este normal sau cînd este vorba de asociere cu metastaze hepatice sau cu coriocarcinom ovarian primar (13).

7.4.2. ANTIGENUL CARCINOEMBRIONAR (CEA)

A. *Considerații generale*

CEA este o substanță din grupul numit „antigene asociate cu tumorile" (TAA = Tumoral Associated Antigens). Izolat din adenocarcinomul de colon (62), CEA este o glicoproteină cu GM de aproximativ 200 000 daltoni, cu mobilitate electroforetică de tip beta-globuline. CEA este prezent în tumorile tractului digestiv și în intestinul fetal. Studii detaliate la normali și la pacienți cu procese tumorale și în alte situații fiziologice și patologice au devenit posibile o dată cu dezvoltarea sistemelor RIA specifice pentru CEA (63, 64, 65, 66, 67, 68, 69) și a disponibilității truselor complete. Deși nu este specific unui anumit tip de tumoare (66, 67, 70), CEA este totuși un indicator auxiliar util pentru diagnosticul tumorilor tractului gastrointestinal și al altor tumori și este un ajutor prețios pentru supravegherea eficienței terapeutice (1, 71, 72).

B. *Pregătirea bolnavului și a probelor de sînge*

Sîngele poate fi recoltat la orice oră, fără vreo pregătire specială. Se ia o priză de 10 ml sînge într-o eprubetă care conține 20 mg EDTA. Plasma separată este folosită pentru dozare. Pe buletinul de însoțire se consemnează dacă este vorba de diagnostic de prezumție sau cert și dacă pacientul este în faza pre- sau postoperatorie.

C. *Indicațiile clinice ale măsurării CEA și rezultate*

La normali, concentrația CEA în plasmă este sub 2—3 ng/ml. Totuși, semnificația valorilor între 3 și 10 ng/ml este dificil de precizat, aproximativ 10% din normali avînd valori între aceste limite. Valori între 10 și 20 ng/ml se observă la numai 1—2% dintre persoanele normale dar probabilitatea bolii canceroase crește. Peste 20 ng/ml, prezența unui proces canceros cu sau fără metastaze devine aproape certă.

Frecvența cazurilor CEA pozitive (cu valori peste 10 ng/ml) variază după localizarea procesului canceros (tabelul II.7.3).

Tabelul II.7.3.

Frecvența cazurilor CEA pozitive la bolnavi canceroși

Localizarea cancerului	Procente
Pancreas	90
Plămîn	75
Colon și rect	70
Stomac	60
Sîn	45

Interpretarea rezultatelor este destul de dificilă deoarece mulţi necanceroşi pot fi CEA pozitivi, de exemplu marii fumători, bolnavii cu pneumopatii cronice (bronşite ş.a.), cei cu ciroză hepatică alcoolică, cu pancreatite, cu boli inflamatorii ale tubului digestiv, cu ulcer peptic etc. La bolnavi cu metastaze în ficat pot fi observate valori de peste 100 ng/ml, iar în cancerul avansat, concentraţia CEA poate fi în limitele observate la normali.

BIBLIOGRAFIE

1. **Bagshawe K. D.** — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine 1977" IAEA, Viena, 1978, vol. II (sub tipar).
2. **Chard T.** — Human placental lactogen levels as a guide to foetal well-being, The Radiochemical Centre, Amersham, England, 1975, p. 1—23.
3. **Braunstein G. D.** — New engl. J. Med., 1975, *293*, 1 339.
4. **Chen H. C., Hodgen G. D., Matsura S., Lin L. J., Gross E., Reichert L. E., Birken S. V., Canfield R. E., Gross E.** — Proc. Nat. Acad. Sci., 1976, *73*, 2 885.
5. **Bagshawe K. D.** — În: IAEA Research co-ordination meeting on „In vitro Procedures and Techniques", Londra, 29. XI.—31. XII. 1976.
6. **Kardana A., Bagshave K. D.** — J. Immun. Methods., 1976, *9*, 297.
7. **Taymor M. L.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson şi R. S. Yalow), North — Holland Publ. Co., Amsterdam, American Elsevier Publ. Co. Inc., New York, 1973, p. 776.
8. **Josimovich J. B., Atwood B. L.** — Amer. J. Obstet. Gynec., 1964, *88*, 867.
9. **Tyrey L., Handwerger S., Sherwoold L. M.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe şi H. R. Behrman), Academic Press Inc., New York, 1974, p. 427.
10. **Vaitukaitis J.** — J. clin. Endocr. Metab., 1973, *37*, 505.
11. **Naughton M. A., Merrill D. A., McManus L. M., Fink L. M.** — Cancer Research, 1975, *35*, 1 887.
12. **Horne C. H. W., Reid J. N., Milne G. D.** — Lancet, 1976, *2*, 279.
13. **Landon J.** — „Supra Regional Assay Service" (SAS), 1976, 2.2.76.
14. **Varma K., Larragan L., Selenkow H. A.** — Obstet. and Gynec., 1971, *37*, 10.
15. **Spona J. von., Janisch H.** — Wien. Klin. Wschr., 1972, *84*, 285.
16. **Josimovich J. B., MacLaren J. A.** — Endocrinol., 1962, *71*, 209.
17. **Josimovich J. B., Atwood B. L., Gross D. A.** — Endocrinol., 1963, *73*, 410.
18. **Li C. H., Grumbach M. M., Kaplan S. L., Josimovich J. B., Friesen H., Catt K. J.** — Experientia (Basel), 1968, *24*, 1 288.
19. **Wostenholme G. E. W., Knight J. (editori)** — Lactogenic Hormones, Ciba Found Symp., Mai 1971, Edinburgh, Churchill, Livingstone, 1972, p. 400.
20. **Kaplan S. L., Grumbach M. M.** — Science, 1965, *147*, 751.
21. **Payne R. A., Ryan R. J.** — J. Urol., 1972, *107*, 99.
22. **Friesen H.,** — Endocrinol., 1965, *76*, 369.
23. **Florini J. R., Tonelli G., Breuer C. B., Coppola J., Ringler I., Bell P. H.** — Endocrinol 1966, *79*, 642.
24. **Catt K. J., Moffat B., Niall H. D.** — Science, 1967, *157*, 321.
25. **Scherwood C. M.** — Proc. Nat. Acad. Sci., 1967, *58*, 2 307.
26. **Niall H. D., Hogan M. L., Sauer R., Rosenblum I. J., Groeenwood F. L.** — Proc. Nat. Acad. Sci. (Wsch.), 1971, *68*, 866.
27. **Sclarra J. J., Kaplan S. L., Grumbach M. M.** — Nature (Lond.), 1963, *199*, 1 005.
28. **Crosignani P. G., Nencioni T., Brambati B.** — J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 1972, *79*, 122.
29. **Beck P., Daughaday W. H.** — J. clin. Invest., 1967, *46*, 103.
30. **Grumbach M. M., Kaplan S. L., Vinik A.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson şi R. S. Yalow), North Holland Publishing Co., Amsterdam — New York, 1973, vol. 2 B, p. 807.
31. **Beck P., Parker M. L.** — J. clin. Endocr., 1965, *25*, 1 457.
32. **Frantz A. G., Rabkin M. T., Friesen H.** — J. clin. Endocr., 1965, *25*, 1 136.
33. **Kaplan S. L., Grumbach M. M.** — J. clin. Endocr., 1965, 25, 1 370.

Scanned with OKEN Scanner

34. Samaan N., Yen S. C. C., Friesen H., Pearson O. H. — J. clin. endocr., 1966, *26*, 1 303.
35. Spellacy N. M., Carlson K. C., Birk S. A. — Amer. J. Obstet. Gynec., 1966, *95*, 118.
36. Saxena B. N., Refetoff S., Emerson K., Selenkow H. A. — Amer. J. Obstet. Gynec., 1968, *101*, 874.
37. Sciarra J. J., Sherwood L. M., Varma A. A., Lundberg W. B. — Amer. J. Obstet. Gynec., 1968, *101*, 413
38. Genazzani A. R., Aubert M. L., Casoli M., Fioretti P., Felber J. P. — Lancet, 1969, *2*, 1 385.
39. Leake N. H., Burt R. L. — Obstet. Gynecol., 1969, *34*, 471.
40. Aubert M. L., Neri P., Genazzani A. R., Cocola F., Felber J. P. — Ann. Sclavo, 1970, *12*, 689.
41. Josimovich J. B., Kosor B., Boccella L., Mintz D. H., Hutchinson D. L. — Obstet. Gynecol., 1970, *36*, 244.
42. Singer N., Desjardins P., Friesen H. G. — Obstet. Gynecol., 1970, *36*, 222.
43. Lechtworth A. T., Boardman R. Bristow C., Landon J., Chard T. — J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 1971, *78*, 535.
44. Weintraub B. D., Rosen S. W. — J. clin. Endocr., 1971, *32*, 91.
45. Handwerger S., Sherwood L. M. — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe şi H. R. Behrman), Academic Press Inc., New York, 1974, p. 417.
46. Ray B.P., Friesen H.G. — In: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (B.M. Jaffe a. H.R. Behraman editors), Academia Press, New York, 1979, p. 831.
47. Genazzani A. R., Cocola F., Casoli M., Melo G., Scarselli G., Neri P., Fioretti P. — J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 1971, *78*, 577.
48. Ress L. J. — Clinical Endocrinol., 1976, *5*, 363.
49. Rouslahti E., Pihko H. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, *259*, 85.
50. Ruoslahti E., Seppälä M. — Int. J. Cancer., 1971, *8*, 374.
51. Chayvialle J. A. P., Ganguli P. C. — Lancet, 1973, *1*, 1 355.
52. Purves L. R., Purves M. — S. Afr. med. J., 1972, *46*, 1 290.
53. Pecek M., Voiculetz N. — Immunochemistry, 1974, *11*, 771.
54. Abelev G., Asseritova I., Kdasvsky I., Perova N., Perevodchicova N. — Int. J. Cancer., 1967, *2*, 551.
55. Purves L. R., Branch W. R., Geddes E. W., Manso C., Portugal M. — Cancer, 1973, *31*, 578.
56. Waldmann T. A., McIntire K. R. — Cancer, 1974, *34*, 1 510.
57. Tsung S. H. — Arch. Path., 1955, *99*, 967.
58. Ziskorsky N., Kordac V., Masopust J., Obrovska D., Stepan J. — Gann, 1974, *65*, 193.
59. Kohn J., Weaver P. C. — Lancet, 1974, *2*, 334.
60. Matsumoto Y., Suzuki T., Ono H., Nakase A., Honjo I. — Cancer, 1974, *34*, 1 602.
61. Kurata K., Sekiguchi K., Takino H., Kato S., Nishi S., Hirai H. — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 2, p. 299.
62. Gold P., Freedman S. O. — J. Exp. Med., 1965, *121*, 439.
63. Thomson D. M. P., Krupey J., Freedman S.O., Gold P. — Proc. Nat. Acad. Sci., 1969, *64*, 161.
64. Chu T. M., Reynoso G. — Clin. Chem., 1972, *18*, 918.
65. Egan M. L., Lautenscheger J. T., Coligan J. E., Todd C. W. — Immunochemistry, 1972, *9*, 289.
66. Laurence D. J. R., Stevens U., Bettelheim R., Darcy D., Leese C., Turneville C., Alexander P., Johns E. W., Neville A. M. — Brit. Med. J., 1972, *3*, 605.
67. Reynoso G., Chu T. M., Guinan P., Murphy G. P. — Cancer, 1972, *30*, 1.
68. Franchimont P., Debruche M. L., Zangerlee P. F., Proyard J. — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 2, p. 267.
69. Laurence D. J. R., Stevens U., Darcy D. A., Turneville C., Neville A. M. — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 2, p. 275.
70. Weintraub B. D., Rosen S. N. — Metabolism, 1973, *22*, 1 119.
71. Skarin A. J., Deliviche R., Zamcheck N., Lokich J. K., Frei E. — Cancer, 1974, *33*, 1 239.
72. Booth S. N., Jamiesen G. C., King J. P. G., Leonard J., Dates G. D., Dykes P. W. — Brit. Med. J., 1974, *4*, 183.

Scanned with OKEN Scanner

8

HORMONII STEROIZI

8.1. INTRODUCERE

Spre deosebire de hormonii polipeptidici, pentru a căror cantificare în lichidele biologice dispunem rareori de o altă metodă comparabilă cu RIA, pentru hormonii steroizi se poate recurge şi la metodele chimice şi la cele radiocompetitive. Criteriile opţiunii pentru o metodă chimică, pentru una radiocompetitivă cu tranzine sau cu anticorp, sînt legate de scopul urmărit şi de disponibilitatea tehnică. Soluţia optimă este accesul la ambele categorii de metode, iar atunci cînd este posibil, şi la metoda gaz-cromatografică.

8.1.1. CLASIFICARE ŞI NOMENCLATURĂ

Clasificarea steroizilor se poate face în multiple moduri. Practic, două clasificări sînt mai importante pentru radioimunolog: una se bazează pe chimia acestor hormoni (fig. II.8.1.), iar cealaltă ţine seama de fiziologia lor şi de terapia cu hormoni steroizi (tabelul II.8.1).

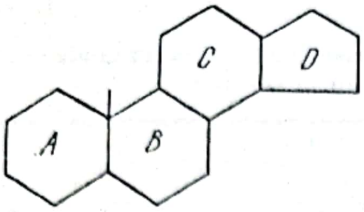
Steroizii reprezintă o clasă de compuşi organici care conţin nucleul ciclopentan perhidrofenantren. În funcţie de numărul şi de poziţia carbonilor în molecula steroidiană, aceşti compuşi pot fi clasificaţi în patru grupe, dar numai trei cu implicaţii în problemele RIA: grupa steroizilor C_{21} sau pregnan, a steroizilor C_{19} sau androstan şi a steroizilor C_{18} sau estran (1).

Nomenclatura steroizilor este de două feluri: uzuală şi sistematică (tabelul II.8.2.). Nomenclatura sistematică este complexă şi nu poate fi folosită în mod curent, de aceea au intrat în practică o diversitate de denumiri uzuale care, cu unele excepţii, se supun greu intenţiilor de uniformizare (2, 3).

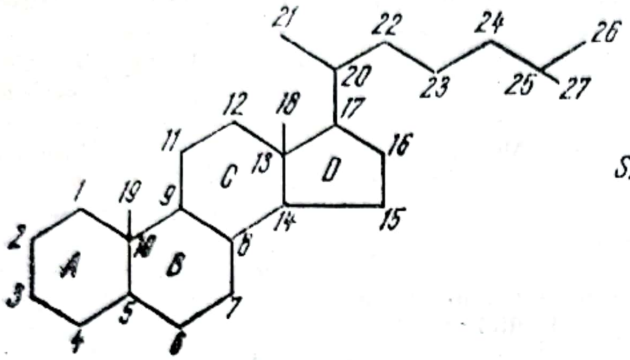
8.1.2. CĂI DE SINTEZĂ LA OM

Aproape toate celulele organismului pot sintetiza colesterolul (steroid C_{27}) dar numai celule specializate îl pot rupe pentru a produce steroizi din grupele pregnan (C_{21}), androstan (C_{19}) sau estran (C_{18}).

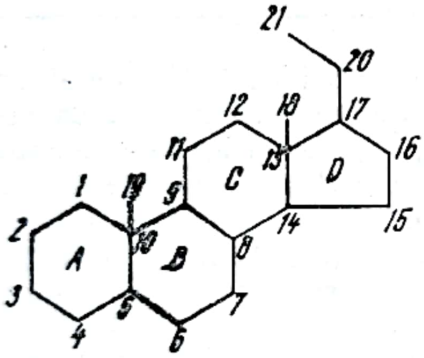
Scanned with OKEN Scanner



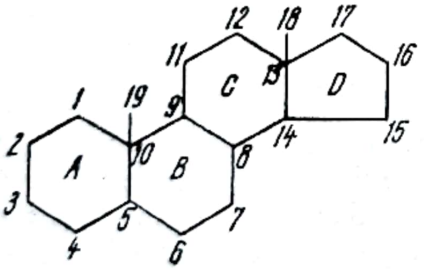
Nucleu ciclopentaperhidrofenantren



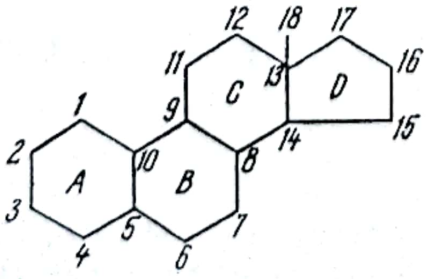
Steroizi C_{21} = grupa colestan



Steroizi C_{21} = grupa pregnan :
- progestativele
- corticosteroizii



Steroizi C_{19} = grupă androstan
androgenii



Steroizi C_{18} = grupa estran :
estrogenii

Fig. II.8.1. Clasificarea chimică a steroizilor (referința 1).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.8.1.

Clasificarea steroizilor din punctul de vedere clinic cu exemple (referința 2)

Sursa	Stadiul metabolic	Efectul endocrin			Corticosteroizi
		Sexoizi			
		Androgeni	Estrogeni	Progestative	
Hormoni	Efectori	testosterona	Estradiol-17 β	Progesterona	Cortisol
sintetizați *in vitro*	Metaboliți	Androsterona	Estriol	Pregnandiolul	Tetrahidrocortizona
Medicamente	Efectori	Metiltestosterona	Mestranol-dietilstilbestrol	Medroxiprogesterona	Prednisolona
	Metaboliți	17 α-metil-1-5 β androstan-3α, 17 β-diol	D-homo-estradiol	6 α-metil-1-17 α-acetoxi-6 β-21-dihidroxi-4-pregnen-3,20 dion	17 α, 20 α, 21-tri-hidroxi-1,4-pregnandien 3,11-dion

Prima treaptă în sinteza hormonilor steroizi de la colesterol este scindarea enzimatică (20 α-hidroxilaza) a acestui steroid pentru a da pregnenolona. În funcție de concentrația enzimelor, a cofactorilor, a substratului lor, a produșilor finali și a altor factori cu rol reglator, organele steroidosecretoare, pornind de la pregnenolonă, aleg căile care duc în final la sinteza androgenilor, estrogenilor și a corticosteroizilor (fig. II.8.2). Calea de sinteză principală este calea Δ^4, care rezultă din conversiunea pregnenolonei-steroid Δ^5 — (cu dubla legătură la C_{3-4}) în progesteronă (steroid Δ^4 — (cu dubla legătură la C_{3-4}). Din progesteronă derivă apoi gluco- și mineralocorticoizii și hormonii sexuali.

8.1.3. LOCUL DE SINTEZĂ

La *femeia* negravidă, cele mai importante surse de hormoni steroizi sînt CSR și ovarul. În timpul sarcinii, placenta devine sursa principală de hormoni steroizi (5). Placenta nu sintetizează colesterol dar îl preia din sîngele periferic al mamei și fătului și îl folosește ca precursor pentru steroizi C_{21}. Placenta nu are enzimele necesare pentru scindarea lanțului lateral al steroizilor C_{21} (desmolaze) și de aceea nu poate sintetiza steroizi C_{19} din steroizi C_{21}, dar ea poate aromatiza eficient steroizi C_{19} la steroizi C_{18} (1).

La *bărbat*, sursa hormonilor steroizi este reprezentată de CSR și de testicul.

8.1.4. CĂI METABOLICE

După sinteză, hormonii steroizi sînt secretați în sîngele periferic, unde circulă în cea mai mare parte sub formă legată la proteine plasmatice sau tranzine și își exercită efectele la nivelul țesuturilor țintă. Numai aldosterona circulă sub formă neconjugată. Se pare că efectul biologic este datorit numai

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.8.2

Nomenclatura uzuală şi sistematică a principalilor steroizi implicaţi în fiziopatologia umană şi animală (referinţa 1 modificat)

Grupa	Denumirea uzuală	Denumirea sistematică
C 21 (Pregnan)	Cortisol (compus F)	Pregn-4-en-11 β, 17 α, 21-triol-3, 20-dion
	Aldosterona (Aldo)	Pregn-4-en-11 β, 21-diol-3, 18, 20-trion
	Corticosterona (compus B)	Pregn-4-en-11 β, 21-diol-3, 20-dion
	Dezoxicorticosterona (DOC)	Pregn-4-en-21-ol-3, 2-dion
	Progesterona (P)	Pregn-4-en, 3, 20-dion
	20 α -hidroxipregn-4-en-3-on (20 α-P)	Pregn-4-en-20 α ol-3-on
	17-hidroxiprogesterona (17-P)	Pregn-4-en-17 α -ol-3, 20-dion
	11-dezoxicortisol (compus S)	Pregn-4-en-17 α, 21-diol-3, 20-dion
	16 α -hidroxiprogesterona (16 α-P)	Pregn-4-en-16 α -ol-3, 2-dion
	Pregnenolona (Δ^5-P)	Pregn-5-en-3 β -ol-20-on
	Pregnenolon-sulfat	Pregn-5-en-3 β -ol-20-on-3 β-sulfat
	17-hidroxipregnenolona (17-Δ^5-P)	Pregn-5-en-3 β, 17 α-diol-20-on
C 19 (androstan)	Dehidroepiandrosterona (DHEA)	Androst-5-en-3 β-ol-17-on
	Dehidroepiandrosteron-sulfat	Androst-5-en-3 β-ol-17-on-3 β sulfat
	16 α -hidroxidihidroepiandrosterona (16 α -DHEA)	Androst-5-en-3 β, 16 α -diol-17-on
	Androstendiol (Δ^5-diol)	Androst-5-en-3 β, 17 α -diol
	Testosterona (T)	Androst-4-en-17 β -ol-3-on
	Androstendiona (A) 5 α -dihidrotestosterona (DHT)	Androst-4-en-3, 17-dion 5 α -androstan-17 β -ol-3-on
C 18 (estran)	Estradiol-17 β (E 2)	Estra-1,3,5-trien-3, 17 β-diol
	Estrona (Ei)	Estra-1, 3, 5-trien-3-ol-17-on
	Estriol (E 3)	Estra-1,3,5-trien-3, 16 α, 17 β-triol

fracţiunii libere a hormonilor steroizi. La femeia în premenopauză, numai 2—3 procente din 17 β-estradiolul activ (neconjugat) şi un procent din testosterona activă mai circulă sub formă liberă, restul fiind capturat de proteinele plasmatice (1, 6).

Mecanismele prin care hormonii steroizi nelegaţi la proteinele plasmatice şi neconjugaţi acţionează asupra celulelor ţintă nu sînt clar descifrate.

Metabolismul periferic al hormonilor steroizi este complex, apărînd numeroşi alţi compuşi (fig. II.8.3.). Metabolizarea are loc în ficat, intestin, în piele şi în alte ţesuturi şi sînt implicate în special procese de oxidare, de reducere şi de conjugare (8). Hormonii steroizi metabolizaţi sînt excretaţi de ficat şi de rinichi în special ca sulfaţi şi glucuronaţi.

Scanned with OKEN Scanner

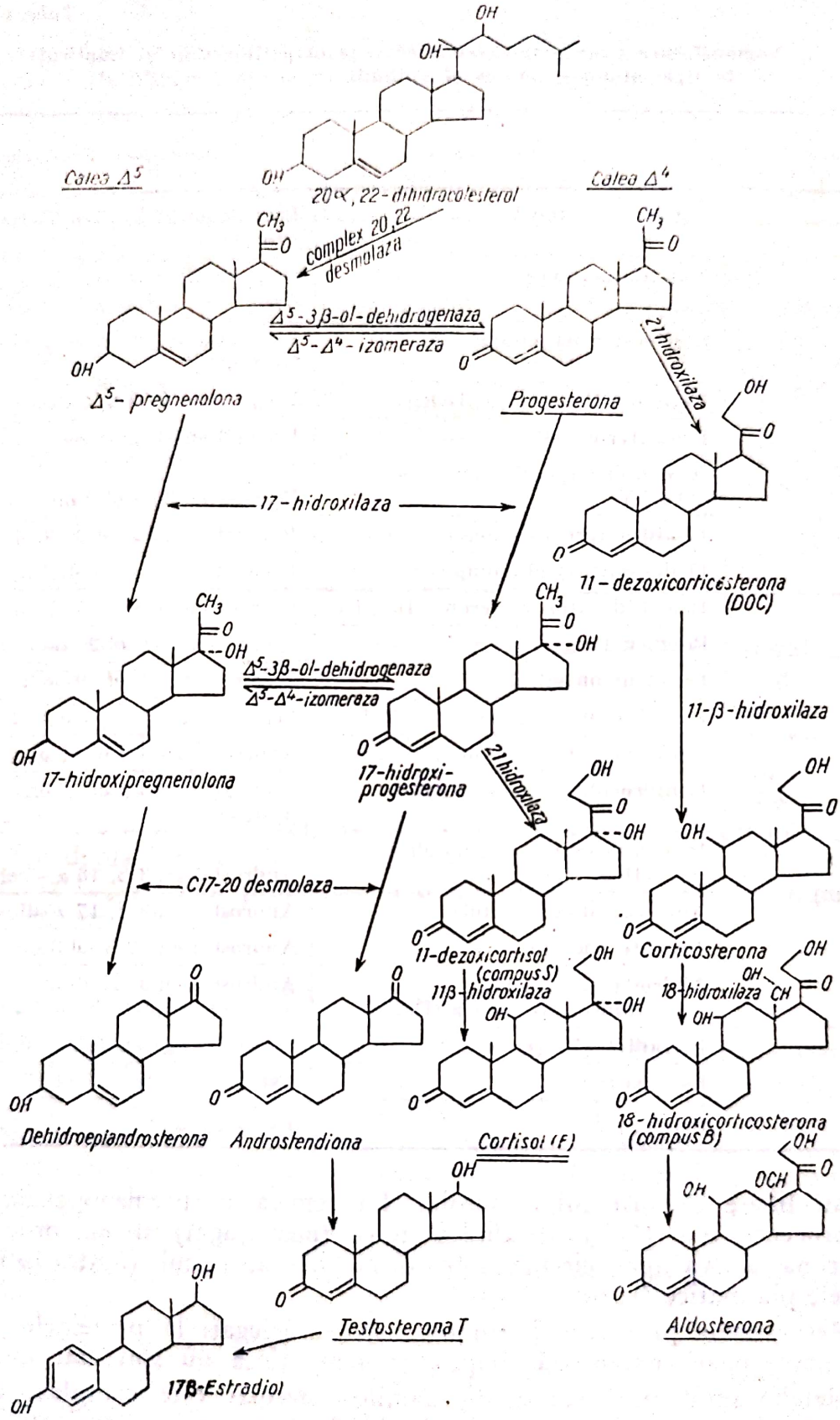


Fig. II.8.2. **Căile de sinteză a hormonilor steroizi (referinţe 1, 4). Sînt subliniaţi steroizii cu cea mai frecventă indicaţie de cantificare în clinica umană.**

Scanned with OKEN Scanner

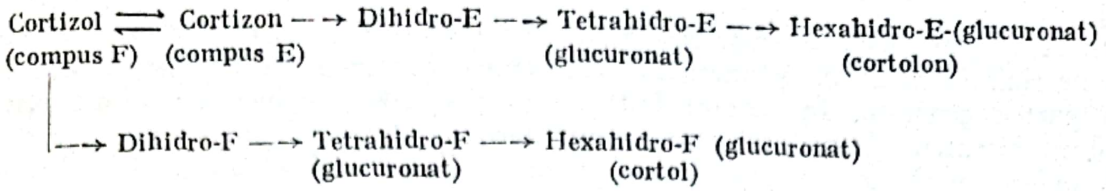


Fig. II.8.3. Căile metabolice principale ale cortizolului (referința 7).

8.2. SISTEME RIA PENTRU HORMONII STEROIZI

Au fost dezvoltate sisteme RIA pentru peste 20 de hormoni steroizi, precursori și metaboliți ai lor. Toate aceste sisteme prezintă multe aspecte comune privind prepararea imunogenului, caracterizarea antiserului, obținerea trasorului, pregătirea probelor biologice, solubilizarea standardului, mediul și condițiile de incubare etc.

8.2.1. IMUNOGENELE

Din punct de vedere imunologic, steroizii sînt haptene, deci nu sînt imunogeni. De aceea, este necesară cuplarea covalentă steroid-proteină prin-

Tabelul II.8.3.

Imunogene folosite pentru obținerea antiserurilor necesare în sisteme RIA pentru hormoni steroizi (referința 1 completat)

Sisteme RIA pentru:	Imunogenul
Steroizi C_{21}	
Pregnenolona	Pregnenolonă-*3*-mono hemisuccinat-PP[a]
Pregnenolon-sulfat	
Progesterona	11 α-hidroxiprogesteronă-11- α-hemisuccinat-PP
17-hidroxipregnenolona	17-hidroxipregnenolonă-*3*-mono hemisuccinat-PP
17-hidroxiprogesterona	17-hidroxiprogesteronă-*3*-oximă-PP
11-dezoxicortisol	11-desoxicortisol-*21*-monohemisuccinat-PP
cortisol ± corticosterona	cortisol-21-hemisuccinat-PP
11-desoxicorticosterona	11-desoxicorticosteronă-*3*-oximă-PP
aldosterona	aldosteronă-*18, 21*-dihemisuccinat-PP
16-α hidroxiprogesterona	16 α -hidroxiprogesterona-*16* α -hemisuccinat-PP
20-α hidroxipregn-4-en-3-on	20-α -hidroxipregn-4-en-3-on-*3*-oximă-PP
Dehidroepiandrosterona (DHEA)	Dehidroepiandrosterona-*3*- β-monohemisuccinat-PP
16 α -hidroxidehidroepiandrosterona	16 α -hidroxi-DHEA 3 β, 16 α -dihemisuccinat-PP
androstendiona	androstendiona-*3*-oximă-PP
Testosterona	Testosteronă-*3*-oximă-PP
5 α -dihidrotestosterona	Testosteronă-*1* α -oximă-PP
	Testosteronă-*6* β -oximă-PP
	Testosteronă-*7* α -oximă-PP
	Testosteronă-hemisuccinat-PP în pozițiile: *11* α, *17* β sau *19*.
17 β -estradiol (E 2)	Estradiol-*17* β -monohemisuccinat-PP
Estradiol glucuronat	Estradiol-*3*-glucuronat-PP
Estriol (E 3) Estrona (E 1)	Estriol-*3*, *16* α, *17* β -trihemisuccinat-PP
Estriol (E 3)	6-ceto-estriol-*6*-oximă-PP

a) – proteină purtătoare (poartă haptena steroidiană la nivelul celulelor imunoreactive).
Notă: sînt subliniate (cursive) pozițiile de conjugare a proteinei la molecula de steroid.

Scanned with OKEN Scanner

tr-una din metodele uzuale. Astăzi, aceste conjugate sînt disponibile pe cale comercială. Principiile şi metodele conjugării steroid-proteină sînt prezentate în partea generală. În tabelul II.8.3. sînt prezentate principalele imunogene folosite pentru obţinerea serurilor antisteroizi. Proteina purtătoare poate fi albumină serică umană sau bovină, tiroglobulină porcină sau bovină, hemocianină etc. Uneori este preferată albumina umană (1). Pentru a obţine un bun imunogen, raportul molar steroid/proteină trebuie să fie mai mare de 20.

8.2.2. ANTISERURILE

Preparatele imunogene steroid-proteină sînt injectate la iepuri adulţi sau capre adulte (peste 2 ani). Doza la capră este de 0,4 mg de conjugat injectat, după emulsionare în adjuvant Freund, în multiple locuri subcutanat în regiunea cefii şi spatelui (1, 9) sau intradermic în aceeaşi regiune. Injecţiile subcutanate sînt repetate săptămînal timp de una-două luni, apoi se repetă lunar pînă se obţin antiseruri convenabile. Sîngerările test se fac la 10—12 zile după fiecare inoculare. Antiserurile sînt testate în sisteme radioimunologice pentru stabilirea titrului, a afinităţii şi specificităţii.

Titrul: animalele cu răspuns imunitar bun produc seruri antisteroizi care la diluţii de 1:1 000 la 1:20 000 dau legare de 50% a trasorului.

Sensibilitatea se testează cu concentraţii progresive de steroid între 0,0025 şi 1 ng în mediul de incubare. Cea mai mică doză de steroid care diferă semnificativ de punctul zero al curbei standard, la limita de confidenţă de 95%, reprezintă sensibilitatea sistemului RIA. Practic, sensibilitatea este acea doză de steroid care corespunde răspunsului în punctul zero minus 2 DS (1).

Specificitatea se testează pentru fiecare antiser cu fiecare dintre steroizii înrudiţi la o gamă de concentraţii de 0,1—100 ng. Se calculează procentul reacţiei încrucişate a unui antisteroid X cu un steroid înrudit Y din formula (1):

$$\frac{\text{doza de steroid X care scade cu 50\% legarea trasorului}}{\text{doza de steroid Y care scade cu 50\% legarea trasorului}} \times 100.$$

De exemplu, steroidul X scade cu 50% legarea trasorului la o doză de 5 pg, pe cînd steroidul Y scade legarea trasorului cu 50% la o doză de 100 pg, atunci:

$$\% \text{ reacţie încrucişată} = \frac{5}{100} \times 100 = 5\%$$

În cazul steroizilor, cînd reacţia încrucişată a steroidului înrudit este de acelaşi ordin ca şi a steroidului folosit ca haptenă, antiserul poate fi folosit pentru dozarea în lichidele biologice a steroidului înrudit, după prealabila separare cromatografică, aşa ca în sistemul RIA pentru corticosteronă cu ser anticortisol sau sistem RIA pentru estronă cu ser antiestriol (tabelul II.8.4).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.8.4.

Reacţii încrucişate ale serurilor antisteroizi cu steroizi înrudiţi (referinţa 1)

Grupa	Steroidul inoculat	Steroidul care poate interfera cu reacţie încrucişată >10%
C_{21}	Cortisol	Corticosterona
	Pregnenolona	Pregnenolon-sulfat
	Progesterona	17-hidroxiprogesterona 11-dezoxicortisol
	20 α -hidroxipregn-4-en-3-on	20 β -hidroxipregn-4-en-3-on
	17-hidroxiprogesterona	17-hidroxipregnenolona
	16 α -hidroxiprogesterona	progesterona 20 α -hidroxi pregn-4-en-3-on dezoxicorticosterona
C_{19}	Testosterona	5 α -dihidrotestosterona androstendiona
	androstendiona	dehidroepiandrosterona
	dehidroepiandrosterona	16 α -hidroxidehidroepiandrosterona androstendiona
C_{18}	Estriol	Estradiol-17 β
		Estrona

8.2.3. STEROIZII MARCAŢI

În practică, se utilizează două categorii principale de steroizi radiomarcaţi: steroizi tritiaţi şi steroizi ioduraţi. În unele sisteme de analiză steroidul este marcat cu ^{75}Se, de exemplu ^{75}Se-Cortisol (10), cu o enzimă (11) sau cu un virus (12).

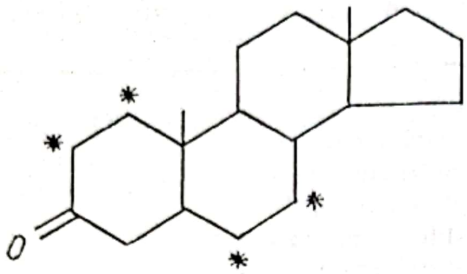
Activitatea specifică a steroizilor tritiaţi utilizată în RIA este de 25—100 Ci/mmol, cu o încorporare de 1—4 atomi de ^{3}H per molecula de steroid, iar a steroizilor marcaţi cu ^{125}I variază între 2 200 şi 4 400 Ci/mmol, cu o încorporare de 1—2 atomi de radioiod per moleculă (13).

Sensibilitatea sistemelor RIA cu derivaţi ^{125}I-steroid este comparabilă cu a sistemelor cu steroizi tritiaţi (1, 9, 14). Antiserurile fiind produse cu derivaţi steroid-proteină, anticorpul recunoaşte mai uşor steroidul iodurat, cînd derivatul folosit pentru iodurare are o configuraţie similară cu a celui folosit pentru imunizare. De aceea şi legarea la antiser a steroidului tritiat poate să crească de 3 ori pentru derivaţii steroid-oximă şi de peste 4 ori pentru derivaţii steroid-lizin-oximă (15) (fig. II.8.4). Prezenţa atomilor de tritiu în molecula steroidiană pare să influenţeze afinitatea de legare a anticorpului (1). S-a observat de exemplu că serul anti-estradiol-17 are constanta de afinitate de 10 ori mai mică într-un sistem RIA cu trasor 2, 4, 6, 7-^{3}H-estradiol-17 β decît într-un sistem RIA cu trasor 6,7-^{3}H-estradiol-17 β (19).

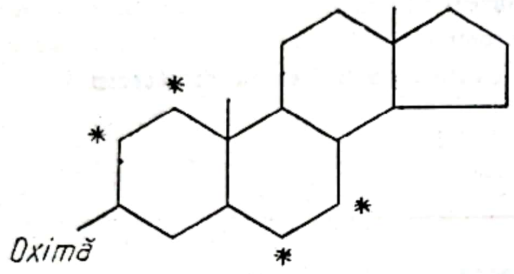
Ca o regulă generală, efectul atomilor de ^{3}H asupra afinităţii serului antisteroid este cel mai mare atunci cînd sînt plasaţi pe molecula steroidiană în poziţii aflate la distanţă de locul de legare al steroidului la proteina purtător folosită pentru imunizare (1). Această diferenţă apare deoarece s-a observat că anticorpul are tendinţa să recunoască porţiuni ale moleculei haptenei plasate la distanţă de locul de conjugare cu proteina.

Scanned with OKEN Scanner

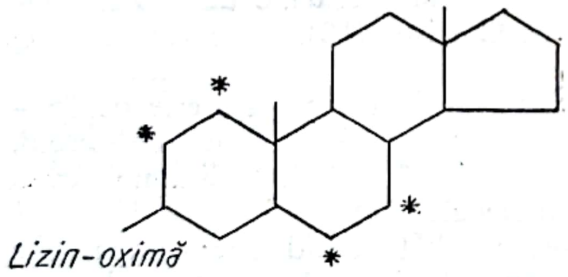
Derivaţii steroid-tirozin-metil-ester (steroid-TME), steroid-hemisuccinat-TME sau clorocarbonat-TME precum şi cei steroid-hemisuccinat-histamină sînt utilizaţi pentru marcarea cu ^{125}I (fig. II.8.5). Pentru steroizii fenolici (estrogeni) s-a încercat iodurarea directă prin încorporarea iodului în inelul A dar s-a observat că scade afinitatea anticorpului pentru steroidul marcat (16). O altă strategie de iodurare a steroizilor este marcarea prealabilă a unei molecule care este ulterior cuplată cu molecula steroidiană (16, 17).



[1,2,6,7-$^3H_4$]-Testosterona



[1,2,6,7-$^3H_4$]-Testosteron-oximă



[1,2,6,7-$^3H_4$]-Testosteron-lizin-oximă

Fig. II.8.4. Testosteronă tritiată şi derivaţii oximă şi lizin-oximă (referinţa 15) (*poziţia atomului de ^3H).

Majoritatea antiserurilor sînt obţinute prin imunizare cu derivaţi de steroid cuplaţi cu reziduuri lizină ale proteinei. De aceea, compuşii ioduraţi de tip steroid-tirozină-metil-ester (TME) folosiţi ca trasori în RIA ar putea să nu dea rezultate bune din următoarele motive (1):

— anticorpii antisteroid conţin *situs*-uri de legare nu numai pentru molecula steroidului ci şi pentru reziduul lizină al proteinei (1, 18);

— după formarea legăturilor peptidice între gruparea carboxil a derivatului de steroid şi gruparea amino a lizinei sau a TME, configuraţia din vecinătatea legăturii peptidice este diferită cu voluminosul metil-ester lîngă legătura peptidică steroid-TME în comparaţie cu un singur atom de hidrogen lîngă legătura peptidică steroid-lizină;

— gruparea voluminoasă metil ester reprezintă un obstacol pentru potrivirea adecvată a anticorpului la steroid-TME, ceea ce scade constanta de afinitate şi implicit sensibilitatea şi specificitatea sistemului RIA.

Steroizii marcaţi se conservă la rece sau prin congelare, în solvenţi organici adecvaţi (tabelul II. 8.5), cu o concentraţie a radioactivităţii de 25—50 μ Ci/ml solvent pentru steroizii tritiaţi. În aceste condiţii, steroizii tritiaţi rămîn stabili aproximativ 6 luni, pe cînd cei ioduraţi maximum 2 luni.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a stabiliza steroizii marcați, se adaugă colesterol în concentrație de 1 pg/μCi de steroid tritiat (1).

În sistemul de dozare, steroizii marcați sînt dizolvați în tamponul de lucru la o concentrație de 0,1 μCi/ml tampon, pentru cei tritiați. Dizolvați în tampon, steroizii tritiați rămîn stabili la 4°C pînă la 4 săptămîni, pe cînd cei iodurați numai 7 zile.

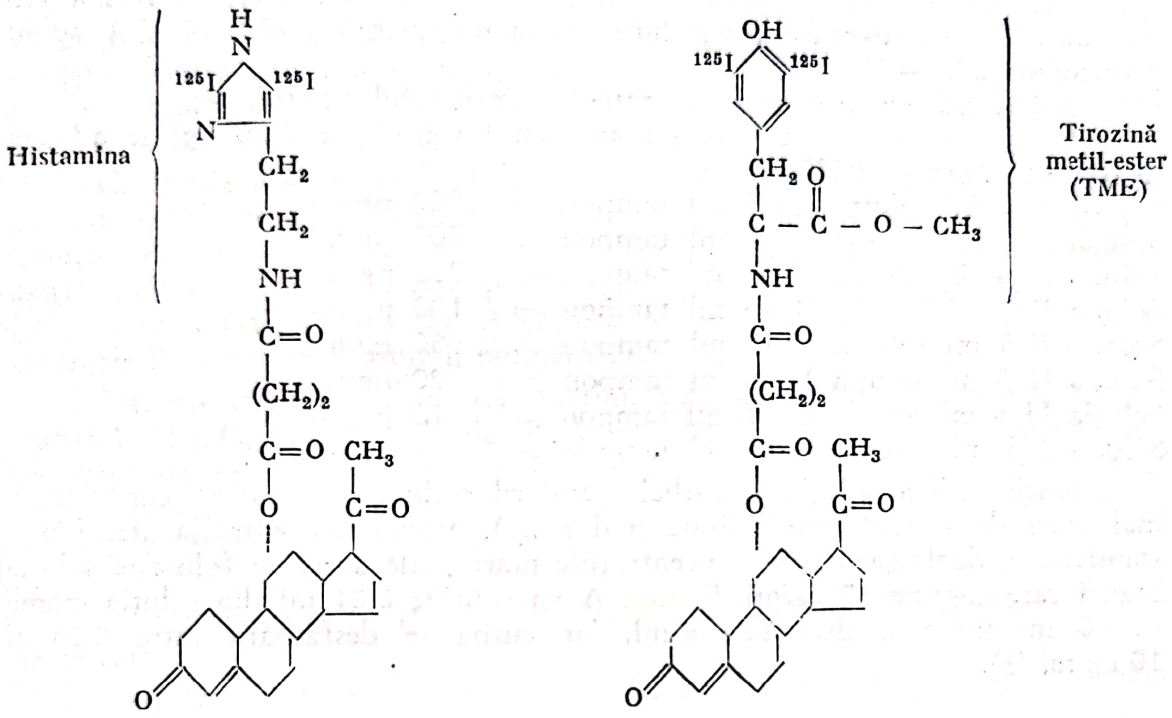


Fig. II.8.5. Structura chimică a derivatului hemisuccinat de progesteronă cuplat cu histamina sau cu tirozina.

Tabelul II.8.5.

Conservarea steroizilor tritiați (referința 1)

Solventul	Concentrația (μCi/ml solvent)	Temperatura °C	Steroidul
Benzen: etanol (9:1)	25 – 50	4 – 8	C_{21} { P; Δ 5-P; 17-P; 20α -P;
			C_{19} { A; DHEA; T; DHT;
			C_{18}: E_1; E_2
Etanol	25 – 50	−20 la −40	C_{21}: 16 α-P; compus S; compus B; compus F; DOC; Aldo; 17-Δ 5-P
			C_{19}: Δ 5-diol; 16 α-DHEA;
			C_{18}: E_3

Scanned with OKEN Scanner

8.2.4. STANDARDELE

Soluţia mamă se prepară o dată pe an şi se conservă la —20°C în etanol, timp de 12 luni. Prepararea soluţiei mamă este o treaptă foarte importantă întrucît orice greşeală se repercutează asupra rezultatelor unui an întreg. De aceea se alege o zi mai tihnită cînd se pot prepara soluţiile fără perturbări (1).

Preparatele folosite ca standard sînt steroizi comerciali în forma cea mai pură. Se pot prepara trei soluţii mamă de exemplu: 100, 10 şi 1 μg/ml şi se conservă la —20°C.

Soluţiile de lucru pot fi preparate după exemplul următor (1):

Soluţia A 20 μl din soluţia mamă cu 1 μ g/ml (deci 20 ng) se adaugă la 10 ml tampon = 2 000 pg/ml.

Soluţia B 5 ml soluţia A+5 ml tampon = 1 000 pg/ml
Soluţia C 5 ml soluţia B+5 ml tampon = 500 pg/ml
Soluţia D 4 ml soluţia C+6 ml tampon = 200 pg/ml
Soluţia E 5 ml soluţia D+5 ml tampon = 100 pg/ml
Soluţia F 5 ml soluţia E+5 ml tampon = 50 pg/ml
Soluţia G 5 ml soluţia F+6 ml tampon = 20 pg/ml
Soluţia H 5 ml soluţia G+5 ml tampon = 10 pg/ml
Soluţia I 5 ml soluţia H+5 ml tampon = 5 pg/ml.

Dacă ultima soluţie a curbei standard trebuie să conţină concentraţii mai mari de steroid (sensibilitate mai mică), atunci concentraţia steroidului standard se deplasează spre concentraţiile mari şi de aceea se foloseşte soluţia mamă care conţine 10 μ g/ml. Soluţia A va conţine 0,01 ml din soluţia mamă în 10 ml tampon, deci 10 ng/ml, iar curba se desfăşoară între 0,05 şi 10 ng/ml (1).

8.2.5. PROBELE BIOLOGICE

A. *Recoltarea.* Cu excepţia unor estrogeni, steroizii sînt molecule robuste şi de aceea nu sînt necesare precauţii speciale în timpul recoltării. Nu s-a studiat, comparativ, în mod sistematic nivelul steroizilor în *ser* sau în *plasmă*. Se recomandă să se opteze, fie pentru ser, fie pentru plasmă şi să se menţină opţiunea pentru a evita surse de eroare (1).

Probele de *urină* trebuie ferite de infectare deoarece bacteriile hidrolizează steroizii conjugaţi şi apar valori fals crescute pentru steroizii neconjugaţi.

Ţesuturile (gonade, SR, placentă) trebuie congelate imediat pentru a preveni metabolizarea steroizilor după ablaţia ţesutului.

La *lichidul folicular* recoltat din ovare se adaugă un anticoagulant pentru a împiedica formarea cheagului de fibrină.

B. *Conservarea.* Îngheţul şi dezgheţul repetat al probelor de ser sau de plasmă produc hidroliza steroizilor conjugaţi şi apar astfel valori fals crescute pentru steroizii neconjugaţi.

Nu s-a studiat sistematic efectul conservării pe termen lung asupra concentraţiei steroizilor în lichidele biologice. În laboratoare cu experienţă îndelungată s-a ajuns totuşi la unele concluzii (1).

— Probele de ser sau de plasmă pot fi conservate pînă la 2 ani dacă sînt menţinute la —20° în flacoane închise etanş.

Scanned with OKEN Scanner

— Dacă este necesar ca conservarea să se facă în soluţie apoasă, ca în cazul mediilor de incubare în care sînt menţinute ţesuturile, proteine inerte ca gelatina, în concentraţie de 0,1 la 0,5 g%, ameliorează stabilitatea.

— Steroizi nepolari ca progesterona, pregnenolona şi androstendiona sînt foarte instabili cînd sînt conservaţi la —20°C în soluţie apoasă fără proteine. În aceste condiţii, nivelul steroidului scade cu 50—80% după 6 luni de conservare.

— Cînd se măsoară concentraţia steroizilor şi în mediul de incubare şi în ţesutul incubat, mediul de incubare trebuie conservat la —20°C cu proteine inerte, iar ţesutul se omogenizează în soluţia salină cloruro-sodică sau în tampon în proporţie de 0,1 g de ţesut în 5 ml de tampon şi se conservă la —20°C cel puţin 6 luni.

C. *Prelucrarea probelor biologice.* Cu cît sistemul RIA este mai specific cu atît purificarea prealabilă a probelor biologice devine mai puţin necesară. Soluţia ideală este ca sistemul de analiză să fie foarte specific şi sensibil astfel încît să nu fie necesară purificarea probelor şi să fie folosite cantităţi mici de material biologic (1). Această situaţie ideală este realizată numai în sistemele RIA pentru hormonii polipeptidici.

Întrucît serurile antisteroizi reacţionează încrucişat şi cu steroizi înrudiţi (tabelul II.8.4), dacă sistemele RIA nu sînt întrutotul specifice, probele biologice trebuie supuse uneori unor procedee de purificare. Gradul de purificare necesar este dictat de cîţiva factori, care trebuie să fie cunoscuţi de cei care lucrează (1):

— specificitatea antiserului;

— concentraţia relativă a steroizilor perturbatori în lichidul biologic de cercetat;

— interferenţa nespecifică a lipidelor şi proteinelor plasmatice, tisulare etc.

a) *RIA în ser sau plasmă neprelucrată.* Dacă un steroid se află în concentraţie mare comparativ cu steroizii care pot interfera în sistem, prelucrarea probelor biologice nu mai este necesară (1). Cortisolul, pregnenolon-sulfatul şi DHEA-sulfatul pot fi cantificaţi direct în ser. Interferenţa steroizilor înrudiţi este evitată diluînd serul în tamponul de lucru, de exemplu 1:30 pentru cortisol, 1:100 pentru pregnenolon-sulfat şi 1:1 000 pentru DHEA-sulfat.

b) *Prelucrarea prin denaturarea proteinelor.* Cînd sistemul RIA este suficient de specific dar nu destul de sensibil pentru a permite diluarea probelor biologice, interferenţa proteinelor este diminuată prin încălzire (20) sau prin precipitare cu alcool (21). Ambele procedee sînt utilizate pentru steroizii care sînt legaţi strîns de proteinele plasmatice.

c) *Extracţia selectivă cu solvenţi organici.* Cînd steroizii perturbatori sînt fie mult mai polari, fie mult mai puţin polari decît steroidul care se măsoară, atunci steroizii perturbatori pot fi îndepărtaţi prin extracţie selectivă cu solvenţi (1). Un exemplu este sistemul RIA pentru progesteronă, sistem perturbat de corticoizi prezenţi în concentraţie mare în plasmă, dar care sînt însă mai polari decît progesterona. De aceea, progesterona poate fi izolată din ser prin extracţie cu un solvent nepolar ca petrol, eter sau hexan, corticoizii rămînînd în ser. Recuperarea progesteronei este supravegheată cu ajutorul trasorului ^{3}H-P. (1).

Scanned with OKEN Scanner

d) *Purificarea cromatografică.* Specificitatea sistemelor RIA pentru steroizi este mult ameliorată cu ajutorul cromatografiei. Sînt folosite cîteva sisteme cromatografice pentru purificarea steroizilor destinaţi cantificării prin RIA. Dintre acestea, aplicabilitatea cea mai largă o are cromatografia pe microcoloane de celită (1) (tabelul II.8.6).

Tabelul II.8.6.

Sisteme cromatografice şi utilizarea lor pentru purificarea steroizilor utilizaţi în sisteme RIA (după referinţa 1)

Sistem cromatografic	Steroidul cantificat
Celită-microcoloane	E_1, E_2-17 β; E_2-17 α; E_3; T, 5 α -DHT; A; Δ^5 -P; 17-Δ^5 -P; DHEA; 16 α -DHEA; P; 17-P; 16 α -P; 20 α -P; Aldo; Compus B; Compus S;
Sephadex LH-20 — coloane	E_1; E_2-17 β; E_3; P; 17-P; Aldo
Gel de siliciu-cromatografie	E_2-17 β DHEA, Δ^5 -P Aldo Compus B Compus F
Cromatografie pe hîrtie	DHEA-sulfat Aldo DOC 17-Δ^5 -P
Alumină (oxid de aluminiu) microcoloane	T; A P

8.2.6. CONDIŢIILE DE INCUBARE

Mediul de incubare este alcătuit dintr-un sistem tampon, la care se adaugă azidă de sodiu 1 g/l şi gelatină 1 g/l.

Nu există studii sistematice asupra influenţei pH-ului, a forţei ionice sau a compoziţiei chimice a tamponului, asupra caracteristicilor steroidului sau ale antiserului. Gelatina creşte precizia şi diminuează valoarea „blancului", deoarece creşte solubilitatea steroizilor mai puţin polari (1, 22).

Tamponul de lucru trebuie încălzit la 40°C înainte de a dizolva steroizi purificaţi pentru a le creşte solubilitatea. Apoi se lasă tamponul să se echilibreze cu reziduul uscat de steroid purificat, timp de 1—2 ore înainte de pipetare. Nu toţi steroizii se dizolvă în tamponul RIA cu aceeaşi rată, aceasta depinzînd de polaritatea şi concentraţia lor dar şi de poziţia atomilor de ^3H în molecula trasorului.

Temperatura de incubare este obişnuit 4°C pentru intervale de 4—24 de ore. Sensibilitatea creşte la temperatură joasă dacă interacţiunea anticorp-steroid este dominată de entalpie (1, 23). Sînt folosite însă şi sisteme RIA cu incubare scurtă la temperatura de 37°C.

Scanned with OKEN Scanner

8.2.7. TEHNICA DE SEPARARE

Tehnica de separare uzuală este adsorbţia trasorului liber pe cărbune-dextran dar sînt folosite şi sisteme cu dublu anticorp.

8.2.8. PERFORMANŢELE SISTEMELOR RIA

Criteriile de fiabilitate sînt specificitatea, sensibilitatea, exactitatea şi precizia (1, 9).

Specificitatea unui sistem RIA pentru steroizi este demonstrată pe două căi:

— Steroizii rămaşi în fracţiunea purificată, în care se măsoară un anumit steroid, se arată că nu interferează în sistem, fie pentru că nu reacţionează cu antiserul, fie pentru că concentraţia lor este prea redusă faţă de cea a steroidului măsurat.

— Există o concordanţă între concentraţiile observate prin metoda RIA şi cele observate cu alte metode (de exemplu colorimetrice).

Sensibilitatea curbei standard este definită, în general, ca cea mai mică cantitate de hormon care diferă semnificativ de zero la o limită de confidenţă de 95%. Sensibilitatea curbei standard este o rezultantă a mai multor factori:

— afinitatea antiserului;
— masa trasorului şi a anticorpului introduse în sistemul RIA;
— volumul amestecului de incubare;
— precizia sistemului RIA.

Acest tip de sensibilitate este comun tuturor sistemelor RIA. În ceea ce priveşte steroizii, se ţine seama şi de al doilea tip de sensibilitate şi anume: sensibilitatea de detectare a unui steroid în *lichidele biologice* (1).

Acest al doilea tip de sensibilitate este dictat la rîndul său de:

— sensibilitatea curbei standard şi
— valoarea „blancului".

„Blancul" este un efect nespecific şi nedorit al sistemului RIA. Criteriile uzuale de fiabilitate sînt incomplete în absenţa estimării blancului. Soluţia ideală pentru a evalua „blancul" este să se măsoare un compus într-un lichid biologic lipsit de compusul pe care îl măsurăm şi astfel să se aprecieze mărimea efectului nespecific (1). În sistemele RIA pentru steroizi, se foloseşte serul sau plasma din care au fost îndepărtaţi steroizii prin tratare cu cărbune (1). Blancul poate fi pozitiv sau negativ. Blancul pozitiv scade fracţiunea legată, iar cel negativ o creşte. Nu se cunosc compuşii organici sau anorganici care dau blanc pozitiv în RIA pentru steroizi. Se crede că efectul de blanc este o rezultantă a acţiunii mai multor compuşi, inclusiv contaminarea accidentală cu steroizi.

Compuşii care interferează cu adsorbţia fracţiunii libere în cursul separării, de exemplu pe cărbune, dau blanc negativ. Efectul de blanc negativ ar putea fi dat de un exces de lipide şi de proteine.

Sursele obişnuite de blanc pozitiv în RIA steroizilor sînt:

— solvenţii;
— sistemul cromatografic;
— sticlăria;

Scanned with OKEN Scanner

— evaporările repetate;
— contaminarea de la personalul feminin în cursul gravidității.

Efectul blancului este eliminat prin anumite calcule de corecție (1).

Exactitatea se apreciază cu ajutorul testelor de recuperare: se adaugă cantități cunoscute de steroid la ser fără steroizi, se calculează cantitatea măsurată și se corelează cu cantitatea adăugată. Teoretic, ar trebui să se obțină un coeficient de corelație egal cu 1,0. În practică, apar abateri datorite erorilor de metodă și de manevrare. Exactitatea acceptabilă necesită o recuperare a steroidului adăugat la ser (sau plasmă) fără steroizi în limitele de 80—120%.

Precizia sistemului RIA este estimată calculînd variația intraserie pe probe în duplicat; variația interserii se estimează măsurînd aceeași probă în duplicat în serii diferite. Coeficientul de variabilitate față de media pe replicate interserii este, obișnuit, mai mare decît cel intraserie (24). Coeficientul de variație admisibil trebuie să fie sub 20% atît intra- cît și interserii (1).

8.2.9. TRUSELE RIA

Reactivi, standarde și truse complete sînt disponibile pe cale comercială. Deseori însă, probele biologice necesită prelucrări prealabile pentru extracția și purificarea steroizilor, de aceea laboratorul trebuie să dispună de solvenți, sisteme cromatografice etc., de cea mai bună calitate. Pentru supravegherea tratamentului cu steroizi, pentru controlul abuzului de steroizi anabolizanți la sportivi și pentru alte scopuri au fost dezvoltate sisteme RIA pentru detectarea steroizilor folosiți ca medicamente. Evident, trusele RIA de exemplu pentru progesteronă, testosteronă pot fi folosite și pentru urmărirea terapiei cu aceste substanțe.

8.3. ASPECTE CLINICE

8.3.1. CONSIDERAȚII GENERALE

În organism, steroizii există sub multiple forme, cea dominantă depinzînd de lichidul biologic. În *urină* de exemplu, steroizii se află în *totalitate* sub formă *conjugată* ca sulfați, β-glucuronidați etc. În *sînge*, un procent important se află sub formă *neconjugată* și sînt steroizi, ca de exemplu cei lipsiți de gruparea oxidril cum sînt progesterona și androstendiona, care circulă numai sub formă neconjugată. Atît steroizii neconjugați cît și cei conjugați pot fi *legați* la proteinele circulante sau tranzine (proteine extracelulare) și la proteinele intracelulare sau receptorii celulari. De aceea, cînd se eliberează un rezultat privind cantificarea unui steroid într-un lichid biologic, este necesar să se specifice forma steroidului măsurat (1):

— total (legat și nelegat) neconjugat,
— total (legat și nelegat) conjugat,
— total (legat și nelegat) plus conjugat și neconjugat,
— total conjugat.

Metodele colorimetrice permit măsurarea metaboliților hormonilor steroizi excretați în urină sub forma conjugată. Cu metodele RIA se măsoară steroizii în sînge, unde se află în special sub forma neconjugată. Extracția

Scanned with OKEN Scanner

serului cu solvenţi nepolari elimină steroizii conjugaţi care rămîn în ser, iar cei neconjugaţi legaţi şi nelegaţi trec în solvent şi pot fi măsuraţi după redizolvarea reziduului uscat în tampon. Majoritatea datelor RIA din literatură se referă la steroizii serici totali legaţi şi nelegaţi (1).

Pentru a diferenţia şi calcula fracţiunea steroidului seric neconjugat legat de cel neconjugat nelegat, este necesar să se practice metoda dializei la echilibru (1, 6).

8.3.2. STEROIZI CSR

Fiziopatologia axei hipotalamus (CRF) — hipofiză (ACTH) — CSR (Cortisol) a fost expusă în capitolul 2. Aldosterona a fost inclusă în sistemul RAA (cap. 6).

Principalii hormoni CSR măsuraţi prin metode RIA sînt glucocorticoizii: cortisolul, corticosterona, 11-dezoxicortisolul şi mineralocorticoizii: aldosterona, dezoxicorticosterona şi, în plus, 17-α-hidroxiprogesterona, un precursor al cortisolului.

Ponderea solicitărilor clinice înclină spre cortisol, 17-α-hidroxiprogesteronă şi aldosteronă.

A. *Cortisolul*

Pentru metoda radiocompetitivă cu transcortină ca proteină de legare, sînt necesare etape preliminare de extracţie a plasmei şi a altor lichide biologice. Metoda RIA permite dozarea directă a cortisolului în plasma neprelucrată (25). Faţă de metoda fluorimetrică, metoda RIA şi cea radiocompetitivă nu sînt perturbate de compuşii fluorogeni administraţi ca medicamente.

Pregătirea bolnavului şi a probelor de sînge. Rezultatul nu este influenţat de alimentaţie, de poziţia corpului sau de activitatea fizică obişnuită. Trebuie evitată orice formă de stres. Probele se recoltează între orele 9 şi 10 dimineaţa şi între orele 22 şi 24, pentru a controla prezenţa sau absenţa ritmului circadian. Se poate lucra pe ser sau pe plasma obţinută din sîngele heparinat. Serul separat de pe cheag este conservat la —20°C; poate fi transportat de la un centru spitalicesc la laborator la temperatura ambiantă.

Situaţiile clinice în care măsurarea cortisolului seric este utilă pentru diagnostic sînt prezentate la cap. 2.3; le reamintim succint: hiper- şi hipofuncţia CSR, supravegherea terapiei în bolile SR. Cortisolul este măsurat în condiţii bazale, în cursul ciclului nictemeral şi în probe dinamice (vezi cap. 2.3 şi tabelul II.8.7).

La normali, nivelul cortisolului plasmatic prezintă ritmicitate circadiană, creşte multiplicativ la stimularea cu ACTH şi scade cu peste un ordin de mărime după administrarea unei doze inhibitorii de dexametazonă (tabelul II.8.7). La femei în postmenopauză, cortisolul creşte procentual.

B. *17 α -hidroxiprogesterona (17-P)*

Aceasta are o singură indicaţie majoră de măsurare prin RIA: hiperplazia suprarenală congenitală prin defect enzimatic la nivelul 21- sau al 11 β-hidroxilazei. Metode alternative sînt dozarea pregnantriolului urinar sau determinarea indicelui de oxigenare în urină. Deoarece, la nou-născut recoltarea urinii este dificilă, se preferă metoda RIA.

Pregătirea pacientului şi a probei de sînge. Sîngele este prelevat după minimum 48 de ore de la naştere, înainte de începerea tratamentului. Proba se recoltează dimineaţa între orele 8 şi 9, cînd concentraţia sanguină a acestui precursor al cortisolului este maximă. Se colectează 1 ml de sînge, prin

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.8.7.

Concentraţia cortizolului plasmatic la persoane sănătoase
Valori orientative (referinţele 1, 25)

Condiţia	Cortisol (μg/100 ml) limite
Ora 8	5,5—20
12	4,5—13,5
16	3,0—11,0
20	2,0—10,0
24	2,0—7,5
La o oră după injecţia i.m. cu ACTH 80 UI:	
recoltare la ora 8 a.m.	30—45
La 8—9 ore după dexametazonă 1 mg *per os*:	
recoltare la ora 8 a.m.	0,2—0,7
Femei în preclimacteriu	7,0—11,5
postclimacteriu	9,0—16,0

puncţie în călcîi sau în fontanelă. După centrifugare, serul este supus dozării imediat deoarece rezultatul este cerut de urgenţă. Cînd dozarea nu se poate face imediat, conservarea se face la +4°C, nu prin congelare (26).

Rezultate: concentraţia 17-P este crescută în cazurile cu hiperplazie suprarenală congenitală, creşte excesiv în aceste cazuri la administrarea ACTH şi scade după administrarea corticosteroizilor. Urmărirea 17-P reprezintă un indicator util pentru stabilirea dozelor terapeutice de corticoizi şi pentru supravegherea evoluţiei sub tratament la copiii cu această boală.

La femei adulte sănătoase, nivelul 17-P prezintă variaţii procentuale şi multiplicative în cursul ciclului menstrual şi creşte cu peste un ordin de mărime în cursul ultimelor două trimestre de sarcină. La femei în postclimacteriu, concentraţia 17-P se reduce la jumătate faţă de perioada adultă (tabelul II.8.8.).

Tabelul II.8.8.

Concentraţia 17α-hidroxiprogesteronei la persoane sănătoase

Grup	17-P (ng/100 ml) limite
Femei:	
faza foliculară	20—70
faza luteală	30—200
sarcină după luna a III-a	200—1 200
postclimacteriu	10—35
Bărbaţi:	30—300

8.3.3. HORMONII STEROIZI GONADICI

Aspecte ale reglării şi controlului hormonilor steroizi gonadici în stare normală şi patologică sînt prezentate în capitolul 2.

A. *Progesterona (P)*

Locul principal al sintezei P este corpul galben; în cantităţi mici, P este sintetizată şi în CSR.

Scanned with OKEN Scanner

La femeia în afara sarcinii, funcţia principală a P este transformarea secretorie a mucoasei uterine. În cursul sarcinii, P este secretată de placentă şi are rol în suprimarea ovulaţiei. Cantificarea P în ser (sau plasmă) se poate face prin metoda radiocompetitivă cu tranzine şi prin RIA, iar în urină este estimată indirect prin măsurarea pregnandiolului — metabolitul său urinar.

Indicaţia clinică majoră pentru măsurarea P este investigaţia funcţiei corpului galben, în special la femei supuse tratamentului pentru sterilitate.

Pregătirea bolnavei şi a probelor de sînge. Nu sînt necesare pregătiri speciale. Sîngele poate fi prelevat la orice oră din zi. După centrifugare, serul este conservat prin congelare la —20°C.

Rezultate. La femei normale, nivelul cel mai scăzut este observat în faza foliculară, creşte procentual imediat înainte de ovulaţie şi creşte multiplicativ în faza luteală, cu un maximum în jurul zilei a 24-a a ciclului menstrual (tabelul II.8.9). Absenţa creşterii concentraţiei P în faza luteală sugerează cicluri anovulatorii şi deficit de corp galben.

Tabelul II.8.9

Concentraţia progesteronei circulante la normali

Grup	Progesterona (ng/100 ml) limite
Femei:	
faza foliculară	50—100
faza luteală	400—1 200
postclimacteriuin	10—20
Bărbaţi:	20—30

La bărbaţi, nivelul circulant al P este similar celui din faza foliculară la femei.

Sînt propuse diferite criterii pentru stabilirea normalităţii ciclului menstrual folosind ca indicator concentraţia P (1, 27, 28, 29). Pentru a aplica criterii riguroase ar trebui să se preleveze sînge un ciclu menstrual întreg, ceea ce este dificil pentru bolnavă şi este şi costisitor. De aceea, au fost propuse criterii mai adecvate (1, 30). Se recoltează de exemplu trei prize de sînge între zilele 5 şi 11 ale ciclului, în orice combinaţie. Se calculează suma concentraţiilor P în cele trei prize de sînge. Dacă suma concentraţiilor P este mai mare de 1 500 ng/100 ml, chiar dacă una din cele trei valori este de 300 ng/ml, ciclul poate fi considerat normal. În cazurile cu cicluri anormale, suma celor trei concentraţii ale P este totdeauna sub 1 500 ng/100 ml, chiar cînd una din cele trei valori individuale este mai mare de 300 ng/100 ml (1, 30).

B. *Estrogenii*

Principalii hormoni estrogeni sintetizaţi în ovar sînt estrona (E 1), estradiolul (E 2) şi estriolul (E 3). Mici cantităţi de estradiol provin din conversiunea periferică a testosteronei.

Mecanismele de reglare şi control ale funcţiei ovarului sînt complexe şi insuficient clarificate. În cursul ciclului menstrual, concentraţia sanguină a estrogenilor variază mult. La femeia în postmenopauză secreţia steroizilor

Scanned with OKEN Scanner

sexuali scade mult, dar estrogenii se sintetizează încă (tabelul II.8.10). În sarcina normală, trofoblastele placentare sintetizează E_3, ale cărui concentrații, în sîngele matern, sînt maxime la sfîrșitul sarcinii. Scăderea E_3 în cursul sarcinii este un indicator al disfuncției materno-fetale.

Tabelul II.8.10.

Concentrația estrogenilor plasmatici la persoane sănătoase (referința 1, 31)

Grup	E_1 (ng/100 ml) limite	E_2 (ng/100 ml) limite	E_3 (ng/100 ml) limite
Femei:			
faza foliculară	4—12	3—7	1—3,5
ovulație	—	6—24	—
faza luteală	7—8	8—18	0,8—1,2
postmenopauză	2—8	<1—2	<1
Sarcina			
sfîrșitul trim. I	110—120	250—300	20—50
II	30—150	240—260	110—130
sfîrșitul sarcinii	1 000—1 300	3 000—3 500	1 200—1 500
Bărbați:	4—4,5	1,8—2,0	8—12

— *Indicațiile clinice ale măsurării estrogenilor.* Sub forma estrogenilor totali urinari sau a estriolului, dozarea este utilă pentru supravegherea sarcinii. Ca estrogeni totali în urină sau ca 17 β-estradiol plasmatic, dozarea este folosită pentru diagnosticul tulburărilor menstruale: oligomenoree, amenoree, menometroragii. Alte indicații sînt: pubertatea precoce, tumorile secretante de estrogeni, stabilirea funcției ovariene în cazurile de intersexualitate, ca în disgenezia gonadică.

— *Pregătirea bolnavului și a probelor de sînge.* Nu sînt necesare pregătiri speciale. Pe buletinul de însoțire a probei se menționează, în afara datelor uzuale, medicația și situația fiziologică: sarcina, ziua ciclului. Serul sau plasma se conservă prin congelare la —20°C.

C. *Testosterona (T)*

Aceasta este sintetizată de celulele Leydig din testicul; la femei, sursa este conversiunea androgenilor suprarenali — dehidroepiandrosterona (DHEA) și androstendiona (A).

La bărbat, sinteza și eliberarea T sînt sub controlul hipotalamusului, prin intermediul gonadoliberinelor (*releasing* factori de gonadotrofine) și al hipofizei prin intermediul LH. După eliberarea sa în circulație, cea mai mare parte a T este legată de unele proteine plasmatice (TeBG = *Testosteron Binding Globulin*, SxBG sau SHBG = *Sex Hormones Binding Globulin*) și numai 1—10% circulă sub formă liberă. Se pare că numai forma liberă este biologic activă și deci pentru a determina gradul de androgenitate nu este necesară măsurarea T totale, ci numai a celei libere.

Hormonul liber circulant străbate membrana celulară a organelor receptoare (prostată, piele) și, în interiorul celulei, printr-un proces de reducere enzimatică, este transformat în dihidrotestosteronă (DHT) care este legată la proteinele receptoare și transportată la locul de acțiune androgenă: nucleul celular. Numai un mic procent al T ajunge nemodificată în urină, peste 95% fiind supusă proceselor metabolice din ficat. Produșii de metabolism rezultați — androsterona și etiocolanolona — sînt excretați în urină după conjugarea lor cu acid glucuronic sau sulfuric.

Scanned with OKEN Scanner

Secreţia T, *la bărbat*, pare să prezinte un aspect bifazic, cu valorile minime seara tîrziu şi cele maxime dis-de-dimineaţă. Amplitudinea oscilaţiilor în jurul mediei pe 24 de ore este de —10% şi +20%, iar între valoarea maximă şi cea minimă diferenţa este de aproximativ 30% (32).

La *femei*, variaţiile în 24 de ore sînt similare cu cele observate la bărbat. În cursul ciclului menstrual nu sînt diferenţe semnificative (32).

Concentraţia androgenilor (legaţi şi nelegaţi) în plasmă depinde şi de rata sintezei şi de concentraţia proteinei transportoare. Proteina transportoare creşte în sarcină, după tratament cu estrogeni şi la femei care iau anticoncepţionale.

Indicaţii clinice ale măsurării T. La *bărbaţi*, secreţia androgenilor este deficitară în hipogonadismul primar (postcastrare) şi în cel secundar dereglărilor hipotalamo-hipofizare. În tumorile testiculare hipersecretante, valorile circulante ale androgenilor pot fi crescute, dar nu se însoţesc de manifestări clinice importante. La femei, hormonii androgeni pot fi crescuţi în hirsutism, în hipertrofia clitorisului, în unele amenoree.

Pregătirea bolnavului şi a probelor de sînge. Nu sînt necesare pregătiri speciale. Sîngele se poate recolta la orice oră din zi, indiferent de momentul ingerării hranei. Postura şi activitatea fizică normală nu influenţează rezultatul.

Dozarea se poate face în ser sau în plasmă, ca şi pentru ceilalţi steroizi. Buletinul de însoţire conţine (în afara datelor uzuale): simptomatologia clinică, vîrsta, sexul, diagnosticul de prezumţie şi orice date de laborator semnificative (de exemplu 17-hidroxisteroizi urinari). De asemenea, se specifică tratamentul tiroidian şi anticoncepţional. Dacă prizele de sînge sînt obţinute în cursul probelor dinamice, se descrie schema probei.

Probele funcţionale. În majoritatea cazurilor, pentru a stabili gradul de funcţionalitate gonadică nu sînt suficiente determinările unicat ale T în urină sau în plasmă. De aceea, aceste determinări sînt completate cu probe dinamice.

I. *Proba de stimulare cu HCG*

Principiul probei: administrarea HCG determină creşterea numai a T de origine gonadică, pe cînd valorile bazale ale T în plasmă sau în urină sînt alcătuite din androgeni CSR şi din conversiunea periferică (fig. II.8.6.). Proba facilitează distincţia între deficitul de sinteză (de exemplu absenţa celulelor Leydig) de un deficit al reglării.

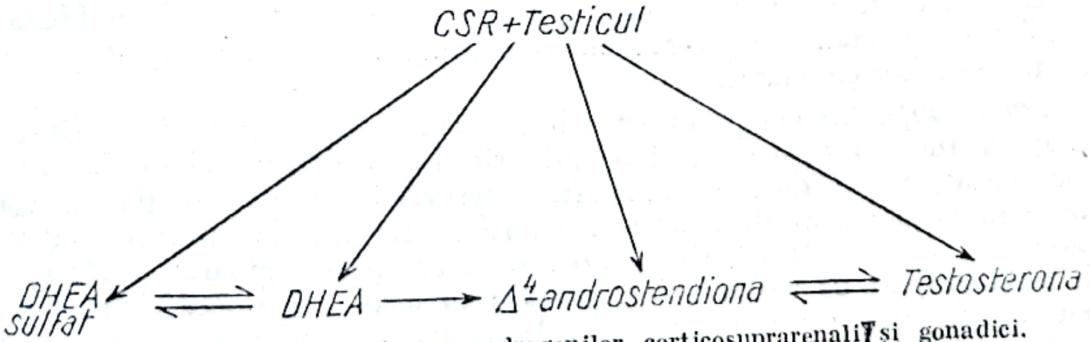


Fig. II.8.6. Interconversiunea androgenilor corticosuprarenali şi gonadici.

Indicaţii pentru proba la HCG. Proba ajută diagnosticul diferenţial: între anorhie şi criptorhidie cu testicule necoborîte sau între cazurile cu testicul feminizant (nereceptivitate periferică la T) şi pseudohermafroditismul masculin (defect de biosinteză a T).

Scanned with OKEN Scanner

Limitele probei la HCG. În unele cazuri cu deficit de gonadotropi, ca de exemplu în sindromul Kallmann, răspunsul este neconcludent (subnormal), iar în unele cazuri de hipogonadism primar (tubular), de exemplu în sindromul Klinefelter, răspunsul poate fi normal.

Descrierea probei: doza și desfășurarea probei la HCG nu sînt suficient de bine standardizate.

Se administrează HCG i.m., fie o doză unică de 5 000 U/m², fie doze zilnice de 1 000—5 000 U, timp de 5 zile.

T urinară sau plasmatică este măsurată înainte și la 2—3 zile după administrare.

O schemă provizorie ar fi următoarea:

În ziua 1, la ora 10 a.m. se ia o priză de sînge pentru determinarea concentrației bazale a T, după care se administrează i.m. 1 500 U de HCG. În zilele 2 și 3 se administrează aceeași doză la aceeași oră. În ziua 4 se recoltează sînge și se administrează din nou HCG. În ziua 5 se recoltează numai sînge.

Rezultate. În condiții *bazale*, la bărbați adulți normali, concentrația T este de 600—800 ng/100 ml ser, iar la femeia adultă normală, de 50—70 ng/100 ml ser. Administrarea HCG la bărbați adulți normali determină creșteri multiplicative pînă la un ordin de mărime ale T circulante. Concentrația T crește de asemenea în tulburări ale secreției gonadotrofinelor hipofizare. În hipogonadismul primar, cînd funcția testiculară este perturbată, concentrația T nu crește.

II. *Proba de stimulare cu LH—RF*

Se administrează i.v. o doză unicat de 25—200 μg de LH—RF. Se recoltează sînge înainte, la 30 și 60 de minute de la administrarea LH—RH. LH crește multiplicativ la normali; nu crește în cazurile cu leziuni hipofizare stabilind astfel rolul hipofizei în instalarea insuficienței gonadice.

III. *Proba de inhibiție cu dexametazonă.* Principiul probei se bazează pe proprietatea dexametazonei de a inhiba eliberarea ACTH și astfel este inhibată și producția androgenilor în CSR, pe cînd eliberarea steroizilor sexuali din ovar nu este influențată. Proba poate stabili dacă producția de androgeni este autonomă ca în tumorile CSR sau ovariene și mai stabilește dacă producția androgenilor este supresibilă, ca în sindromul adrenogenital sau în hiperplazia CSR.

Uneori, chiar cu ajutorul probelor combinate de stimulare cu HCG și de inhibiție cu dexametazonă administrate simultan, nu se poate stabili originea androgenilor circulanți.

Studii populaționale. Sînt situații în care explorarea gradului de normalitate a funcției gonadice, folosind criteriul concentrației T în ser pe probe unicat, poate duce la rezultate interpretabile, cu condiția ca eșantioanele să fie suficient de mari și martorii să fie selecționați corespunzător. În acest sens, în fig. II.8.7. sînt prezentate rezultatele comparative ale măsurării T la grupuri de bărbați care lucrează în mediu cu toxice chimice (33). Acest studiu sugerează grade diferite de acțiune a toxicelor chimice asupra concentrației T în ser. Pentru a stabili relația cauzală este însă necesară măsurarea simultană și a LH, precum și analiza corelației T seric cu concentrația toxicului în lichidele biologice. Acest studiu longitudinal arată totuși frecvența cea mai mare a scăderii T seric la cei expuși la vapori de acrilonitril.

Scanned with OKEN Scanner

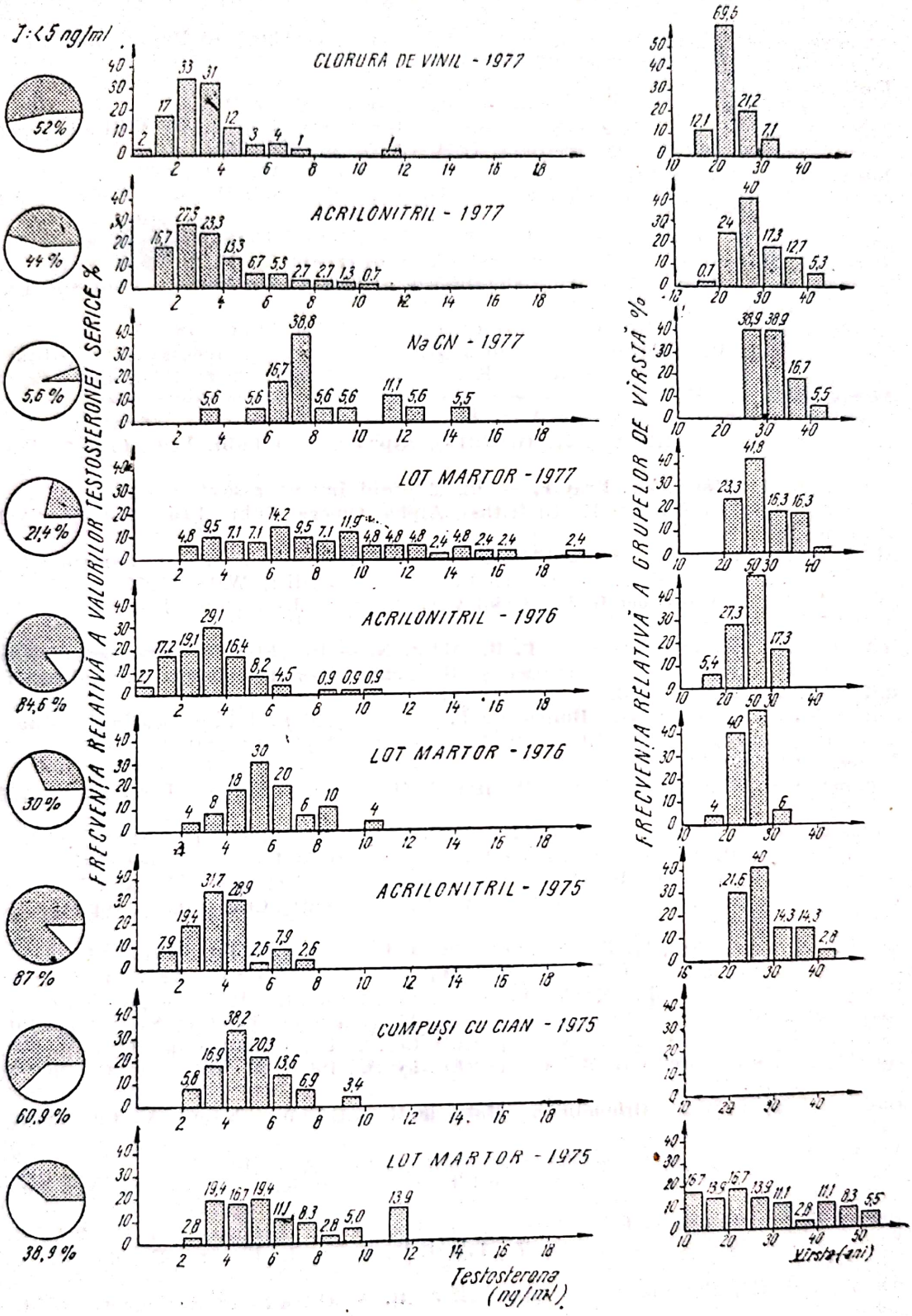


Fig. II.8.7. Concentrația testosteronei în ser, în condiții bazale, la muncitori care lucrează în mediu cu substanțe chimice toxice și la martori de vîrste comparabile. Date obținute de Laboratorul RIA al Centrului de Protecție și Igienă a Muncii al M.I.Ch. (referința 33).

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. **Abraham G. E., Garza R., Manlimos F. S.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay", Marcel Dekker Inc., New York, 1977, p. 591.
2. **Borth R.** — Contraception, 1975, *12*, 373.
3. *** * *** (editorial) — J. Steroid—Biochem., 1972, *3*, 1.
4. **Liddle G. W.** — În: „Textbook of Endocrinology" (editat de R. H. Williams), Saunders Company W. B., Philadelphia, 1974, ed. V, p. 233—282.
5. **Buster J. E., Abraham G. E.** — Obstet. Gynec., 1975, *46*, 489.
6. **Chopra I. J., Abraham G. E., Chopra U., Solomon D. H., Odell W. D.** — New. Engl. J. Med., 1972, *286*, 124.
7. **Sandberg A. A., Slaunwhite W. Roy Jr.** — În: „Steroid Hormones" (editat de R. I. Dorfman), Noord-Hollandsche Uitgevers-Mij., Amsterdam C., N. Z., 1975, p. 125—237.
8. **Dorfman R. I., Unger F.** — În: „Metabolism of Steroid Hormones", Academic Press. Inc., New York, 1965, p. 289.
9. **Abraham G. E.** — Acta Endocrinol., 1974, *75*, Suppl. 183, 7.
10. **Chambers V. E. M., Glover J. S., Tudor R.** — În: „Steroid Immunoassay" (editat de E. H. D. Cameron, S. G. Hillier și K. Griffiths), Alpha Omega Publ. Ltd., Cardiff, Wales, 1975, p. 177.
11. **Landon J., Crookall J., McGregor A.** — În: „Steroid Immunoassay" (editat de E. H. D. Cameron, S. G. Hillier și K. Griffiths), Alpha Omega Publ. Ltd., Cardiff, Wales, 1975, p. 183.
12. **Andreiu J. M., Mamas S., Dray F.** — În: „Steroid Immunoassay" (editat de E. H. D. Cameron, S. G. Hillier și K. Griffiths), Alpha Omega Publ. Ltd., Cardiff, Wales, 1975, p. 189.
13. **Abraham G. E.** — În: „Steroid Immunoassay" (editat de E. H. D. Cameron, S. G. Hillier și K. Griffiths), Alpha Omega Publ. Ltd., Cardiff, Wales, 1975, p. 67.
14. **Ismail A. A. A., Niswender G. D., Midgley A. R. Jr.** — J. Clin. Endocr., 1972, *34*, 177.
15. **Jeffcoate S. L., Edwards R., Gilby E. D., White N.** — În: „Steroid Immunoassy" (editat de E. H. D. Cameron, S. G. Hillier și K. Griffiths), Alpha Omega Publ. Ltd., Cardiff, Wales, 1975, p. 133.
16. **Hunter W. M., Nars P. W., Rutherford F. J.** — În: „Steroid Immunoassay" (editat de E. H. D. Cameron, S. G. Hillier și K. Griffiths), Alpha Omega Publ. Ltd., Cardiff, Wales, 1975, p. 141.
17. **England B. G., Niswender G. D., Midgley A. R. Jr.** — J. Clin. Endocr., 1974, *38*, 42.
18. **Abraham G. E.** — În: „Immunologic Methods in Steroid Determination" (editat de F. G. Peron și B. V. Caldwell), Appleton Century-Crofts Inc., New York, 1970, p. 147.
19. **Abraham G. E., Odell W. D.** — În: „Immunologic Methods in Steroid Determination" (editat de F. G. Peron și B. V. Caldwell), Centry-Crofts Inc., Appleton, New York, 1970, p. 87.
20. **Hennan J. F., Collins W. P., Sommerville J. F.** — Steroid, 1973, *21*, 285.
21. **Abraham G. E., Buster J. E., Teller R. C.** — Anal. Lett., 1972, *5*, 757.
22. **Hotchkiss, Atkinson L. E., Knobil E.** — Endocrinol., 1971, *89*, 177.
23. **Abraham G. E.** — În: „Principles of Competitive Protein-Binding Assays" (editat de W. D. Odell și W. Daughaday), Lippincott Co., J. B., Philadelphia, 1971, p. 200.
24. **Abraham G. E., Swerdloff R. S., Tulchinsky D., Odell W. D.** — J. Clin. Endocr., 1971, *32*, 619.
25. **Rolleri E., Zannino M., Orlandini S., Malvano R.** — Clin. Chim. Acta., 1976, *66*, 319.
26. **Landon J.** — Supra Regional Assay Service, (SAS), 2.2.76 (1976).
27. **Abraham G. E., Odell W. D., Swerdloff R. S., Hopper K.** — J. Clin. Endocr., 1972, *34*, 312.
28. **Reeves B. D., Diczfalusy E.** — Amer. J. Obstet. Gynec., 1971, *109*, 775.
29. **Strott C. A., Cargille C. M., Ross G. T., Lipsett M. B.** — J. Clin. Endocr., 1970, *30*, 246.
30. **Abraham G. E., Maroulis G. B., Marshall J. R.** — Obstet. Gynec., 1974, *44*, 522.
31. **Robertson H. A., Smeaton T. C., Durnford R.** — Steroids, 1972, *20*, 651.
32. **Collins W. P., Hennam J. F.** — Molec. Aspects Med., 1976, *1*, 3.
33. **Ivănescu Maria, Târpa A,. Berinde Mihaela** — Al III-lea Congres Național de Endocrinologie, București, 1976, volumul de rezumate.

Scanned with OKEN Scanner

9

HORMONII CALCIOTROPI

9.1. INTRODUCERE

Concentrația calciului total seric variază, în mod normal, în limite restrînse de exemplu între 2,1 și 2,6 mMol/l, din care jumătate este sub formă ionizată și restul este legat de albumină. Interpretarea calcemiei se face numai în corelație cu concentrația albuminei și a proteinelor totale în ser. Pentru investigarea bolnavilor suspectați de anomalii ale metabolismului osos sau calcic sînt necesare determinări ale fosforului anorganic și ale fosfatazei alcaline în ser înainte de a trece la dozarea hormonilor implicați în *homeostazia* calciului.

Dintre constituenții lichidelor extracelulare, calciul este unul dintre cei cărora evoluția le-a asigurat reglarea cea mai complexă. Menținerea homeostaziei calciului este necesară, ținînd seama că nivelul calciului ionizat (Ca^{2+}) este critic pentru multe procese vitale ca excitabilitatea neuromusculară, contracția musculară și permeabilitatea membranei celulare. Concentrația Ca^{2+} seric este o rezultantă a balanței dintre absorbția Ca în intestin și excreția sa în rinichi și între captarea și eliberarea Ca osos (fig. II.9.1.). Controlul de finețe este asigurat de hormonul paratiroidian (Pth) via adenozin-monofosfat ciclic (3′ 5′ cAMP) și de 1,25-dihidroxicalciferol [$1,25(OH)_2D_3$]. Rolul calcitocinei (CT) în menținerea homeostaziei. Ca este încă în studiu. S-a observat totuși, că după ablația tiroidei (sursă de CT) și a paratiroidei, calcemia revine la normal. Rezultă că hormonii, în general, nu inițiază noi reacții sau procese ci controlează rata proceselor fiziologice existente (1,1 bis).

Mecanismele de reglare asigură concentrația constantă a Ca intracelular și în lichidele extracelulare. Deși ingestia Ca este foarte variabilă, reglarea asigură fluctuații circadiene ale Ca extracelular sub 3%.

Tulburările homeostaziei Ca au adesea consecințe grave. Hipocalcemia: scăderea Ca ionizat poate produce tetanie și uneori cataractă. În etiologie se poate detecta deficit alimentar sau de absorbție a Ca și vitaminei D,

Scanned with OKEN Scanner

deficit de sinteză a vitaminei D prin expunere insuficientă la radiații ultraviolete și pierderea excesivă a Ca, ca în lactație.

Hipocalcemia este adesea datorită hipoparatiroidiei prin anomalie paratiroidiană primară ca intervenția chirurgicală, boală autoimunitară sau age-

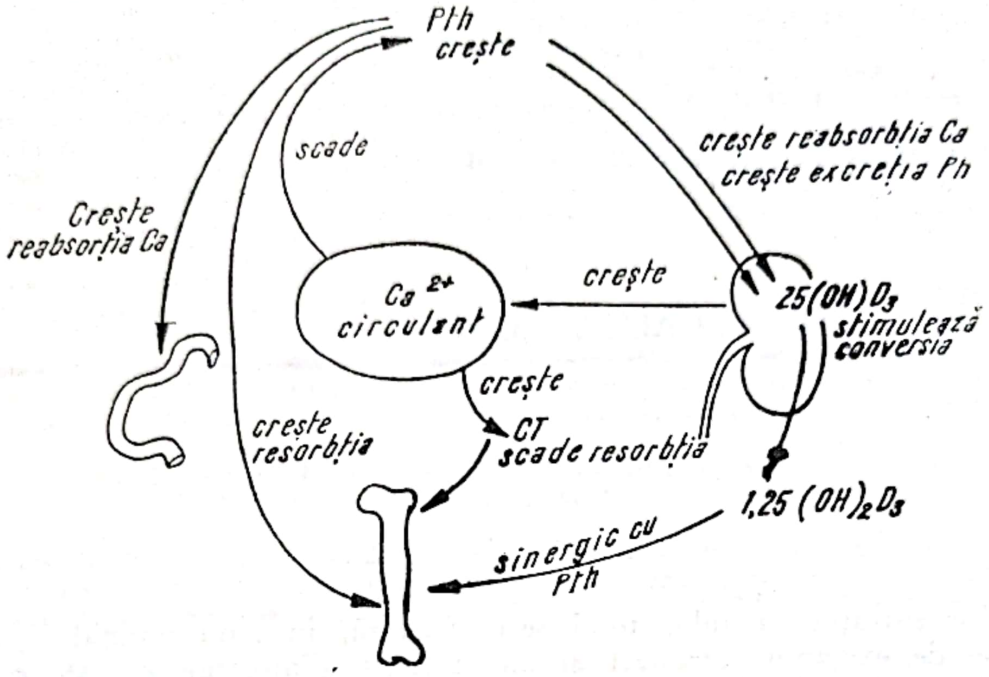


Fig. II.9.1. Homeostazia Ca^{2+} plasmatic. Pth este stimulat de scăderea concentrației Ca^{2+} în plasmă: prin cel puțin patru mecanisme readuce concentrația Ca^{2+} la normal. Creșterea Ca^{2+} stimulează CT care, prin acțiunea de scădere a resorbției osoase, readuce concentrația Ca^{2+} la normal.

nezia paratiroidelor. Formele primare trebuie diferențiate de pseudohipoparatiroidism, care apare în special la fete cu Pth normal dar cu deficit de cAMP. Există și o formă clinică de pseudo-pseudohipoparatiroidism care seamănă cu pseudohipoparatiroidismul, cu deosebirea că nivelul seric al Ca și Pth este normal.

Hipercalcemia este încă mai frecventă și se însoțește de semne și simptome în care sînt implicați rinichiul, scheletul, SNC și SNV.

9.2. HORMONUL PARATIROIDIAN

9.2.1. CONSIDERAȚII GENERALE

A. *Locul de sinteză.* Pth este sintetizat în glandele paratiroide, glande cu distribuție genetică limitată. Ele sînt prezente la mamifere, păsări, reptile și la majoritatea amfibiilor, dar lipsesc la pești. Obișnuit, paratiroidele sînt situate pe fața posterioară a tiroidei cîte una de fiecare parte superioară și inferioară, dar numărul și localizarea lor variază mult. Localizări aberante pot fi în mediastin, mai rar în tiroidă și încă mai rar înapoia esofagului.

B. *Natura chimică.* Primele încercări de izolare a Pth datează din anul 1925 (2), dar numai în ultimele două decenii a fost înfrîntă tenacitatea cu care hormonul este legat de alți constituenți glandulari (3, 4).

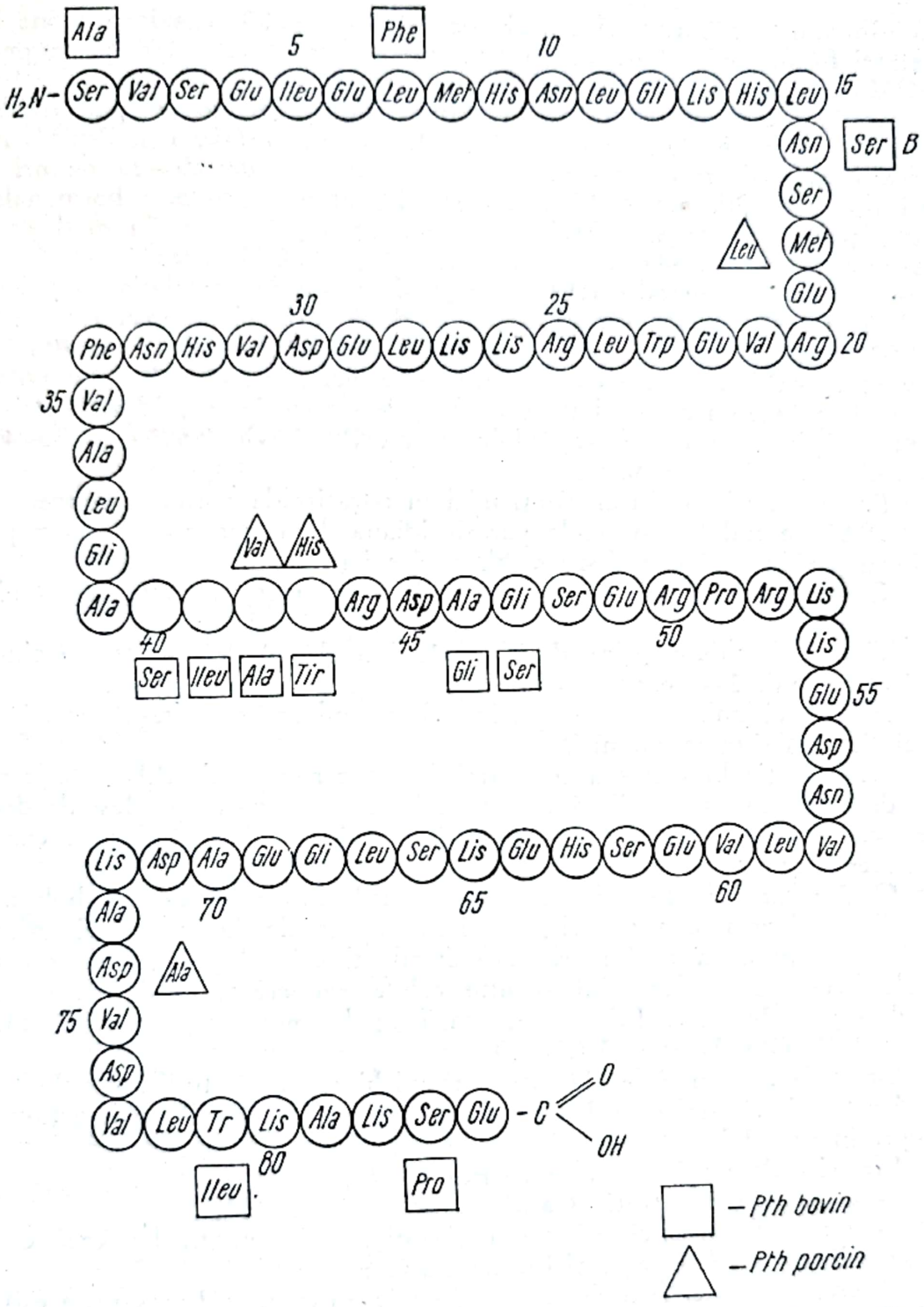


Fig. II.9.2. Secvența aminoacizilor în molecula de Pth uman și comparația cu Pth bovin și porcin (referința 9).

Pth bovin, electroforetic omogen, este un polipeptid cu un singur lanț, format din 84 aminoacizi, cu GM de aproximativ 9 500 daltoni. Pth uman are tot 84 aminoacizi, dar diferă de Pth bovin prin 7 aminoacizi și de cel porcin prin 4 aminoacizi (fig. II.9.2.) (5, 6, 7, 8). Fragmentul 1—34 de la capul N-terminal deține proprietățile biologice.

Scanned with OKEN Scanner

În afară de hormonul „nativ", cu GM de 9 500, sînt identificate încă alte trei forme moleculare: un ProPth, cu GM de 12 500, şi două fragmente cu GM de 7 000 şi 4 500 daltoni.

ProPth a fost identificat în cultura de fragmente de paratiroidă şi conţine un plus de 25 aminoacizi faţă de Pth nativ (10, 11). ProPth reacţionează cu anticorpii anti-Pth dar în concentraţii de 15—20 de ori mai mari decît ale Pth nativ (12). Produsul iniţial al biosintezei hormonale în glanda paratiroidiană este ProPth cu GM de 12 500 care, în mod normal este convertit în molecula de depozit şi de secreţie cu GM de 9 500.

Cu ajutorul metodei RIA au fost detectate în circulaţia sanguină la om Pth „nativ" cu GM de 9 500 şi alte două forme imunoreactive, cu GM de 7 000 şi de 4 500. Pth-9 500 reacţionează cu serul anti-Pth bovin, Pth-7 000 cu serul anti-Pth porcin. Conversiunea moleculelor mari de Pth în molecule mai mici se face cu ajutorul unor enzime de conversie (peptidaze) calciu-dependente. Pth-7 000 are efectele biologice ale Pth bovin 9 500, iar Pth-4 500 activează adenilciclaza renală (1).

ProPth se găseşte în cantităţi mici în paratiroida normală, conversiunea la Pth-9 500 avînd loc în celula paratiroidiană. În cazurile cu adenom paratiroidian se eliberează uneori şi ProPth în circulaţie.

Conversiunea Pth-9 500 în molecule mai mici are loc în circulaţia sanguină.

Timpul de înjumătăţire al Pth-9 500 este de 30 de minute, pe cînd al Pth-7 000 este de 2—4 ore.

În hipocalcemia acută la om, în primele minute se secretă Pth-9 500 şi mai tîrziu apar şi molecule mici.

Semnificaţia biologică a celor trei forme periferice de Pth nu este suficient de clară; se pare însă că formele mici nu reprezintă produşi de degradare, scăderea concentraţiei lor sugerînd mai degrabă un deficit al enzimei de conversie (1).

C. *Funcţia Pth.* Funcţiile majore ale Pth sînt reglarea metabolismului osos şi menţinerea concentraţiei calciului plasmatic la un nivel adecvat funcţionării optime a unei mari varietăţi de tipuri celulare, ca de exemplu celulele beta ale pancreasului şi alte celule endocrine, celule nervoase şi musculare etc. În plus, Pth funcţionează ca hormon trop, reglînd sinteza renală a 1,25 $(OH)_2D_3$ din 25 $(OH)D_3$.

Organele ţintă majore ale Pth sînt rinichiul şi osul. Indirect, prin intermediul acţiunii sale de control renal al sintezei 1,25 $(OH)_2D_3$, Pth acţionează şi asupra intestinului.

Efectele cele mai importante ale Pth sînt (1):

— creşterea concentraţiei Ca plasmatic;

— creşterea excreţiei urinare a fosfaţilor şi a peptidelor care conţin hidroxiprolină şi scăderea excreţiei urinare a Ca;

— creşterea ratei remodelării osoase şi a ratei nete de resorbţie osoasă;

— creşterea osteolizei osteocitelor în os şi creşterea numărului osteoclastelor şi al osteoblastelor la suprafaţa osului;

— creşterea ratei de conversie a 25 $(OH)D_3$ la 1,25 $(OH)_2D_3$ în ţesutul renal;

— activarea adenilciclazei în celulele organelor-ţintă;

— creşterea iniţială a intrării Ca în celulele organelor-ţintă;

— alterarea echilibrului acidobazic în organism;

Scanned with OKEN Scanner

— creşterea absorbţiei gastrointestinale a Ca.

D. *Reglarea secreţiei Pth* se află sub controlul concentraţiei plasmatice a calciului ionic. La persoanele hipocalcemice, ionii de Mg intervin în secreţia Pth. La aceşti factori de reglare se adaugă CT şi metaboliţii vitaminei D (fig. II.9.1.).

9.2.2. METODE DE CANTIFICARE

Metodele biologice sînt laborioase iar sensibilitatea lor este adecvată numai pentru studiul preparatelor de Pth, nu şi pentru cantificarea sa în plasmă.

Obţinerea antiserurilor pentru Pth bovin, cu care Pth uman dă reacţii încrucişate, a permis detectarea Pth în lichidele biologice, prin reacţia de fixare a complexului (13), cu sensibilitatea de 10 ng echivalentă cu 180 mU, deci cu peste două ordine de mărime mai sensibilă decît metoda biologică. Metodele RIA şi IRMA oferă posibilităţi de detectare de aproximativ 10 pg/ml, deci cu trei ordine de mărime superioare metodei imunochimice (fixarea complementului).

9.2.3. RIA PENTRU Pth UMAN

Primul sistem RIA pnetru Pth a fost realizat în 1963 de Berson, Yalow şi colaboratorii (14). Ulterior, au fost dezvoltate sisteme similare (9, 15, 16, 17, 18, 19).

Majoritatea sistemelor RIA pentru Pth uman sînt sisteme heterologe (ser anti-Pth bovin sau porcin, trasor şi standard bovin sau porcin) sau mixte (standard uman).

A. *Imunogenul.* Sînt folosite, fie extracte brute de Pth bovin (9), fie peptide sintetice 1—34 Pth bovin sau uman, omogenizate în adjuvant Freund.

B. *Antiserul.* Inocularea intradermică în multiple locuri cu doze de 50—200 μg de peptid sintetic la capre pare să fie metoda cea mai eficientă (9). Antiserurile sînt conservate la —20°C ca atare. Diluate 1:100 în tampon veronal 0,05 M, pH=8,6 cu BSA 0,25 g/%, 2,5% ser normal de la aceeaşi specie şi mertiolat 0,02 g%, antiserurile pot fi conservate la +4°C, timp de cîteva luni.

Antiserul se diluează 1:200—1:60 000 şi se testează în sistem RIA cu volum de incubare de 500 μl. Curba standard cu diluţia care leagă 50% din trasor Pth bovin permite estimarea constantei de afinitate care este dată de panta celei mai abrupte asimptote şi a capacităţii de legare dată de interceptul acestei asimptote la abscisă. Se pot obţine constante de afinitate de ordinul a 10^{10} l/mol (9).

Serurile anti-Pth sînt heterogene, ele conţinînd populaţii de anticorpi care reacţionează cu mai multe porţiuni ale moleculei (9). Se ştie că Pth circulant este heterogen şi se pot pune în evidenţă fragmente imunologic active, dar biologic inactive (22, 23, 24). S-ar putea ca forma dominantă a Pth circulant să fie un fragment inactiv al capului C-terminal, de aceea este important să fie cunoscută specificitatea antiserului relativ la secvenţa aminoacizilor în molecula intactă (1). Antiserurile cele mai eficiente par să fie cele care recunosc molecula intactă, nu fragmente de tip 1—34 (amino-terminal) sau 53—84 (carboxi-terminal). Această observaţie sugerează existenţa unui *situs* reactiv important între poziţia 35 şi 52 situată la mijlocul moleculei intacte (9).

Scanned with OKEN Scanner

Antiserurile față de molecula intactă (1—84) conțin populații de anticorpi care reacționează nu numai cu un singur *situs* antigenic. Totuși, astfel de antiseruri pot fi folosite pentru sisteme RIA specifice pentru o anumită secvență de aminoacizi a moleculei de Pth, după adsorbția antiserului cu un exces de fragmente de hormon ale cărui *situs*-uri antigenice dorim să le eliminăm (9, 21, 26).

C. *Pth marcat.* Molecula de Pth bovin și porcin poate fi iodurată la nucleul tirozinic din poziția 43. Pth bovin 1—84 este marcat cu ^{125}I prin metoda cu cloramina-T în fiole de sticlă. După întreruperea reacției cu metabisulfit de sodiu se adaugă ser pentru a preveni adsorbția ^{125}I-Pth pe sticlă. Purificarea Pth marcat se face prin adsorbție pe gel de siliciu — Quso G. (27). Puritatea hormonului marcat se testează prin cromatoelectroforeză; hormonul marcat intact (nedegradat) se adsoarbe la origine. Se obțin activități specifice de 250—300 μCi/μg. Hormonul marcat și purificat este stabil 1—2 săptămîni la +4°C (9).

Pth de sinteză, secvența 1—34 om, porc sau bou nu conține nucleu tirozinic, dar nucleele histidină prezente în pozițiile 9, 14 și 32, captează ^{125}I (9, 28).

D. *Standardul.* Sînt folosite diferite preparate de Pth de extracție sau fragmente obținute prin sinteză. Hormonul sau fragmentele lui se diluează în acid acetic 0,001 M și se conservă la —70°C, în probe cu concentrația de 2 μg în 10 μl (9). Curba de referință se practică în limite de 0,1 la 50 ng/ml. Ca standard local, se poate folosi un ser uman cu valori mari ale Pth; rezultatul se exprimă în acest caz în microlitri echivalenți cu serul standard. Deși serul standard este precalibrat cu preparate Pth de referință, totuși prezența formelor heterogene în serul uman nu permite compararea rezultatelor cu cele ale altor laboratoare (9).

E. *Probele biologice.* Prelevarea sîngelui se face dimineața pe nemîncate; concentrația Pth tinde să scadă la prînz și către seară. Sîngele recoltat din vena cubitală este lăsat să exprime serul timp de 30 de minute la temperatura camerei, apoi serul este separat prin centrifugare cu răcire. Serul separat este conservat la —20°C, în eprubete de plastic. Probele de ser pot fi transportate la distanță numai congelate.

F. *Mediul și condițiile de incubare.* S-a observat că tamponul veronal 0,05 M, pH=8,6 cu mertiolat 0,05 g% este mai bun decît sistemele tampon uzuale (fosfat, borat sau tris). Pentru o bună performanță a sistemului RIA este totuși necesar să se testeze pH-ul optim pentru fiecare antiser (19). Inhibitorii enzimatici de tip Trasylol, deși se folosesc, nu par să influențeze mult performanțele sistemului RIA (19).

Concentrația proteică în mediul de incubare este critică, ținînd seama că adsorbția ^{125}I-Pth pe sticlă trebuie diminuată. Tipul de proteină poate influența procentul de alterare a trasorului și adsorbția pe sticlă. De exemplu, albumina serică (bovină, porcină și umană), în concentrație de 1 g%, permite adsorbția pe sticlă a trasorului la procente de 10—15%, pe cînd cu plasmă umană în concentrație de 10% adsorbția se reduce la 4% (19). Se poate folosi plasmă de la pacienți cu hipoparatiroidie dar este mai dificil de procurat în volum mare. De aceea, se recomandă ser diluat 1:6 în tampon veronal. Serul este preparat din plasmă expirată, adăugînd clorură de calciu 50—100 μl din concentrația 20% (W/V) la un ml de plasmă citratată; după 24 de ore la temperatura ambiantă, serul este separat prin centrifugare (9).

Scanned with OKEN Scanner

Incubarea reactivilor se face la +4°C pentru un interval de cîteva zile, în funcţie de afinitatea antiserului. Ca şi pentru sistemele RIA ale altor hormoni, sensibilitatea poate fi sporită prin preincubare.

G. *Tehnica de separare:* majoritatea laboratoarelor folosesc procedeul prin adsorbţie a radioactivităţii libere pe cărbune-dextran (15, 16, 17, 21).

I. *Probleme ale sistemelor RIA-PTH.* Deşi au trecut peste 15 ani de la dezvoltarea primului sistem RIA pentru Pth uman, cantificarea sa nu a devenit încă un procedeu uşor accesibil, deoarece acest hormon pune încă unele probleme (9):

— Pth este degradabil în timpul radioiodurării, iar după marcare devine instabil;

— trasorul este degradat în timpul incubărilor; degradarea de iodurare şi cea de incubare influenţează defavorabil afinitatea antiserului pentru antigen;

— Pth se adsoarbe pe sticlă, inconvenient care poate fi ocolit în mare măsură prin creşterea concentraţiei proteinelor în mediul de incubare, dar în acest fel degradarea de incubare creşte.

Aceste inconveniente pot fi evitate cu ajutorul sistemelor imunoradiometrice (IRMA).

9.2.4. METODA IMUNORADIOMETRICĂ (IRMA)

În acest sistem, Pth este măsurat *direct*, prin legarea sa la anticorpul specific marcat. Probele biologice şi standardul sînt incubate în *exces* de anticorp anti-Pth marcat. După incubare, imunosorbentul (Pth cuplat la o fază solidă) este adăugat pentru a se lega anticorpul marcat care nu a reacţionat. Imunosorbentul este apoi îndepărtat prin centrifugare (fig. II.9.3).

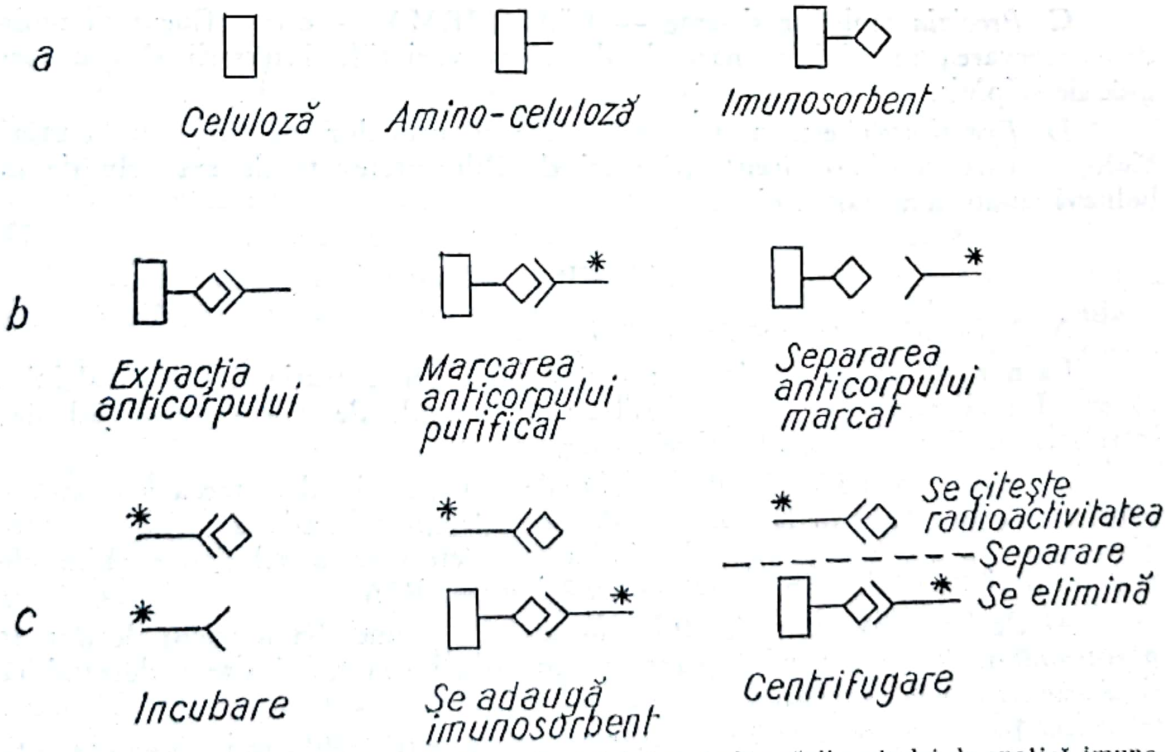


Fig. II.9.3. Reprezentare schematică a principiului şi desfăşurării metodei de analiză imunoradiometrică (IRMA) (referinţa 9):
a — Prepararea imunosorbentului; *b* — prepararea anticorpului marcat; *c* — măsurarea Pth.

Radioactivitatea din supranatant este funcţie de concentraţia Pth (9, 29). În această metodă, sînt folosiţi aceiaşi reactivi ca şi în metoda RIA, cu diferenţa că trasorul nu este antigenul ci anticorpul.

A. *Anticorpul marcat.* Înainte de a proceda la iodurare, anticorpii anti-Pth bovin sînt supuşi unei extracţii cu ajutorul unui imunosorbent obţinut din Pth bovin cuplat cu diazoceluloză (9). Anticorpul astfel purificat şi complexat cu antigenul este supus radioiodurării (după metoda cu Cloramină-T) sub forma sa legată la imunosorbent. După iodurare, anticorpul marcat este disociat de imunosorbent prin tratare cu HCl diluat la pH=2,0 (9).

Conservarea anticorpului marcat prin congelare se pare că nu dă rezultate decît dacă se recomplexează în prealabil pe imunosorbent (9).

B. *Mediul de incubare.* Se foloseşte, ca şi în RIA, tampon veronal 0,05 M, dar la pH=8,0, care la un litru conţine 5 g albumină serică bovină, 20 mg γ-globulină neimună de cobai, 5 g NaCl şi 200 mg azidă de sodiu (9).

9.2.5. PERFORMANŢELE SISTEMELOR RIA ŞI IRMA

A. *Sensibilitatea:* Limita de detectare a sistemelor RIA şi IRMA este similară, şi anume 0,1 ng şi 0,15 ng/ml ser în termeni de standard Pth uman.

B. *Specificitatea.* Fragmentele de Pth obţinute prin sinteză permit dezvoltarea sistemelor RIA pentru diferite zone ale moleculei de Pth, de exemplu, cu ^{125}I-Pth bovin 1—34 se poate măsura fragmentul amino-terminal al Pth mai bine decît cu ^{125}I-Pth bovin 1—84. Fragmentele marcate servesc şi pentru caracterizarea specificităţii antiserului.

În metoda IRMA, cuplarea pe celuloză a fragmentelor nu a moleculei intacte, oferă posibilitatea investigării regionale a moleculei (9).

C. *Precizia* ambelor sisteme — RIA şi IRMA — este influenţată mult de conservarea reactivilor marcaţi, de aceea variaţiile interserii sînt uneori greu de stăpînit.

D. *Exactitatea* este testată cu ajutorul probelor de ser sau ţesuturi biologice care conţin concentraţii mari de Pth, prelevate de exemplu de la bolnavi cu adenom paratiroidian.

9.2.6. ASPECTE CLINICE

A. *Indicaţii pentru măsurarea Pth*

La normali există o relaţie reciprocă între concentraţia Pth şi a calciului în ser. De aceea, interpretarea rezultatelor depinde de calciul seric, calculat în relaţia cu concentraţia albuminei în ser.

— Sistemele RIA şi IRMA actuale nu permit detectarea concentraţiilor fiziologice ale Pth la *normali*, deoarece la aproximativ 25% dintre normali concentraţia Pth cade sub limita de detectare a tehnicilor. Limitele „normalităţii" trebuie stabilite în fiecare laborator RIA.

— Pe baza concentraţiei Pth, nu se poate pune diagnosticul de *deficit paratiroidian* decît în cazul în care concentraţia hormonului este nedetectabilă şi se asociază cu *hipocalcemie.*

— În *hiperparatiroidismul primar* concentraţia Pth seric este crescută dar nu totdeauna. Prezenţa unei concentraţii măsurabile de Pth la pacienţi *hipercalcemici* sugerează diagnosticul de hiperactivitate paratiroidiană.

Scanned with OKEN Scanner

— *Localizarea paratiroidei hipersecretante* se poate face prin măsurarea Pth în vena paratiroidiană. Cu ajutorul unei hărți a topografiei circulației sanguine și a paratiroidelor, cu precizarea locului de prelevare a sîngelui venos, se poate stabili care dintre glande este afectată (30).

— La pacienți cu *producție ectopică* (pseudohiperparatiroidism) de Pth, concentrația Pth în sîngele venos paratiroidian este scăzută sau nedetectabilă.

— O proporție de 5—10% dintre bolnavii cu *calculoză renală* au hiperparatiroidie. În maladii osoase, renale și la pacienți cu tumori, ca și în multe alte situații clinice, se semnalează hiperparatiroidia (1).

B. *Rezultate*

Pth în sîngele periferic

— La *normali* cu normocalcemie, concentrația Pth în ser variază între nedetectabil și 1,0 ng/ml.

— *În hiperparatiroidia primară, fără leziuni osoase*, Pth seric variază între nedetectabil (rareori) și 3 ng/ml; iar în cazurile cu leziuni osoase (osteită fibroasă) concentrația Pth se plasează în limite de la 1,0 la 20 ng/ml.

— *În hiperparatiroidia secundară* (hiperplazie sau adenom) cancerului tiroidian medulosecretor, concentrația Pth seric crește și se observă valori între 0,2 și peste 2,0 ng/ml (31), în special în tipul familial de cancer medular. Se pare că acest hiperparatiroidism apare ca o reacție la hipocalcemia prelungită (1).

9.3. CALCITONINA (CT)

9.3.1. CONSIDERAȚII GENERALE

A. *Locul de sinteză.* Calcitonina (CT) sau tirocalcitonina (TCT) este secretată la mamifere de celule specializate — celulele „C" sau clare — un mic grup de celule interstițiale sau parafoliculare prezente în tiroidă. Uneori, aceste celule se găsesc și în paratiroidă și în timus. Celulele „C" ca sursă de CT, au fost identificate cu ajutorul tehnicii de imunofluorescență.

Celulele „C" din tiroida mamiferelor derivă embriologic din creasta neurală. Celulele medulosuprarenalei au o origine neuroectodermică similară, ceea ce ar explica de ce atît carcinomul medular al tiroidei, cît și feocromocitomul conțin catecolamine și pot apărea la același individ (1).

B. *Natura chimică și imunochimică.* Este cunoscută structura chimică a CT de porc, bou, pește și om și a fost preparată CT de sinteză cu structura hormonului uman. Structura capului aminoterminal al CT de la cele patru specii este identică și constă dintr-un inel cu șapte aminoacizi, închis de o punte disulfidică. Toate cele patru CT sînt molecule alcătuite dintr-o secvență unică de 32 de aminoacizi, cu GM de 3 000 daltoni, cu prolină la capul carboxi-terminal. Se pare că activitatea biologică necesită integritatea moleculei. Este curios că CT de pește este hormonul hipocalcemiant cel mai activ chiar cînd este administrat la mamifere, inclusiv omul. CT umană conține un nucleu tirozinic în poziția 12 (fig. II.9.4); el este prezent în aceeași poziție și în CT bovină și porcină și în poziția 22 la CT de pește.

Scanned with OKEN Scanner

Din tumori ale celulelor „C" ale tiroidei (carcinomul medular) a fost izolată nu numai CT, ci şi un dimer activ al acestei molecule (32).

CT umană nu reacţionează cu serul anti-CT porcină, iar CT bovină, porcină şi ovină nu reacţionează cu serul anti-CT umană. Studii cu fragmente

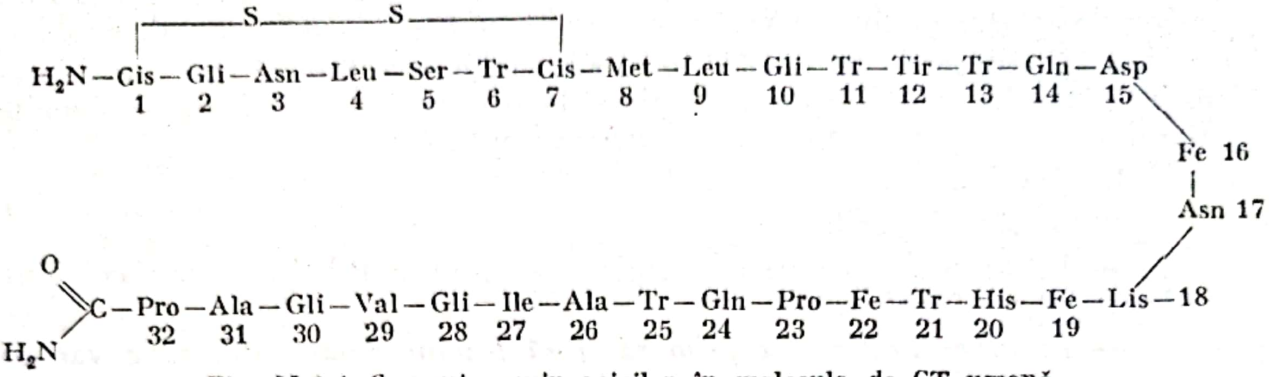


Fig. II.9.4. Secvenţa aminoacizilor în molecula de CT umană.

de CT umană obţinute prin digestie enzimatică sugerează existenţa mai multor determinante antigenice în molecula hormonului (33, 34).

C. *Funcţia CT*. Din punctul de vedere al *homeostaziei calciului plasmatic* la om, CT reglează rata remodelării osoase. Acest rol al CT este evident la tineri şi scade odată cu maturarea osoasă. La adulţi, se poate evidenţia cînd remodelarea osoasă creşte în mod patologic (boala Paget) sau după administrarea Pth.

O altă funcţie a CT este protejarea organismului tînăr faţă de hipercalcemia postprandială. În acest sens, stimularea secreţiei CT de către gastrină este considerată ca o parte a unui arc reflex endocrin care anticipează pericolul potenţial al creşterii concentraţiei calciului în plasmă. La adult, acest efect nu mai poate fi evidenţiat (1).

Ca şi Pth, CT induce o scădere a readsorbţiei tubulare a fosfaţilor, dar prin mecanisme diferite. Dealtfel, efectele CT şi ale Pth asupra excreţiei renale a electroliţilor sînt în parte sinergice, în parte antagonice (tabelul II.9.1.).

Tabelul II.9.1.

Efectele CT şi ale Pth asupra excreţiei renale a electroliţilor (referinţa 1)

Electrolitul	CT	Pth
Fosfaţi	creşte	creşte
Calciu	creşte	scade
Hidrogen	nemodificat	scade
Cloruri	creşte	slab sau absent
Potasiu	creştere uşoară	creşte semnificativ
Magneziu	creşte	scade
Sodiu	creşte	creşte

CT nu stimulează adenilciclaza renală, nu influenţează excreţia urinară a c-AMP şi nici nu blochează creşterea excreţiei urinare a c-AMP indusă de Pth.

Scanned with OKEN Scanner

La bolnavii cu carcinom medular, excreţia renală a calciului nu creşte, resorbţia osoasă este diminuată, iar calciul şi fosforul plasmatic sînt în limite normale.

CT inhibă conversiunea renală a 25 $(OH)D_3$ la 1,25 $(OH)_2D_3$.

Se pare că CT influenţează transportul electroliţilor la ţesuturi.

D. *Reglarea secreţiei CT*. Rata secreţiei CT este funcţie directă de concentraţia calciului plasmatic, cînd concentraţia calciului total este mai mare de 9 mg/100 ml. Între 9 şi 15 mg calciu total/100 ml, CT creşte de la 150 la peste 700 pg/ml (17). Sub 9 mg/100 ml, nivelul CT în plasma umană devine nedetectabil, sensibilitatea actuală a metodei RIA fiind de 50—100 pg/ml.

Concentraţii mari, nefiziologice de Mg^{2+} pot stimula secreţia CT.

Ingestia unei cantităţi mari de calciu induce la tineri creşterea CT înainte de creşterea semnificativă a concentraţiei calciului, sugerînd că probabil o creştere nedetectabilă a calciului ionic este suficientă pentru a influenţa secreţia hormonului.

Numai la tineri injecţia de gastrină sau de pancreozimină induce creşterea concentraţiei CT circulante, pe cînd la adultul normal rezultatele sînt variabile.

9.3.2. METODE DE CANTIFICARE A CT

Metodele biologice *in vivo* se bazează pe capacitatea CT de a scădea calcemia la animale tinere după o dietă săracă în calciu (35, 36, 37). Sensibilitatea metodei este de 50 ng de CT porcină.

Metoda RIA deşi ameliorează sensibilitatea de detectare cu trei ordine de mărime, totuşi variaţiile fiziologice ale CT în plasmă cad sub limita de detectare.

9.3.3. RIA PENTRU CT UMANĂ

Sistemul RIA pentru CT umană este un sistem omolog, dezvoltat şi experimentat, în ultimul deceniu, de cîteva grupuri de cercetători (38, 39, 40, 41, 42, 43).

A. *Imunogenul*. CT naturală sub forma unui extract brut din ţesutul carcinomului medular tiroidian (39, 43, 44, 45) sau peptidul obţinut prin sinteză (33, 39) pot servi ca antigen fără cuplare prealabilă cu o proteină. Imunogenul se prepară din CT dizolvată în HCl, 0,01 N, emulsionată în adjuvant Freund.

B. *Antiserul*. Cobai sau iepuri sînt injectaţi cu doze de 5—100 unităţi MRC CT naturală per animal. Peste 80% din animale produc antiseruri care leagă convenabil CT umană marcată la diluţii de 1:100—1:500 după 2—5 inoculări (43). Peptidul sintetic este inoculat în doze de 100—500 μg per animal. Adsorbţia peptidului sintetic pe cărbune, gel de hidroxid de aluminiu sau cuplarea covalentă cu o proteină nu oferă avantaje importante (43), iar uneori poate chiar să inhibe formarea anticorpilor specifici CT (46).

Antiserurile selecţionate sînt conservate prin congelare şi pot fi dezgheţate de mai multe ori, fără pericol de reducere a capacităţii de legare a CT (43).

C. *CT umană marcată*. CT umană monomer (M) sintetică, dizolvată în apă distilată acidulată cu o picătură de HCl 0,1 N per ml apă, este conservată prin congelare la concentraţia de 100 μg/ml. Se poate folosi

Scanned with OKEN Scanner

2—4 săptămîni. Din această soluţie, 40—50 µl conţin 4—5 µg CT-M. Marcarea se face cu ^{125}I prin metoda cu Cloramina-T.

Produsul total de marcare este purificat pe coloane de Biogel P-10. Se obţin AS de 150—450 µCi/µg. ^{125}I-CT nu este stabilă, ea trebuie folosită în sistemul RIA în primele ore după marcare (43).

D. *Standardul.* Se foloseşte CT-M umană sintetică şi CT naturală, secvenţa tumorală 70/234 (oferită de National Institute for Medical Research, Londra, NW3 6RB). Curba de referinţă cuprinde concentraţii între 2 şi 2 500 pg/ml.

E. *Probele biologice*

Singe. Pentru a uşura compararea rezultatelor, probele se recoltează în condiţii standard, dimineaţa pe nemîncate, după 8—10 ore de repaus fizic şi emoţional. Se poate folosi ser sau plasmă. Singele este recoltat prin puncţie venoasă şi colectat în cupe de plastic. Se lasă la temperatura camerei 30—60 de minute, se separă serul de pe cheag şi se îndepărtează restul de hematii prin centrifugare la rece. Serul este conservat prin congelare sau se foloseşte imediat (41). Probele hemolizate nu sînt utilizabile.

Urina este recoltată fără conservant şi păstrată în stare congelată ca atare sau ca preparate concentrate (47).

Ţesuturi. Se prepară extracte la pH acid la o diluţie de 1:5 şi se foloseşte în sistemul de dozare un volum de 100 µl, ceea ce dă o diluţie finală de 1:25, la un volum de incubare de 500 µl (48). Se conservă la —70°C.

Conservare şi transport. Congelarea la —20°C nu fereşte calcitonina de degradare. Conservarea la —70°C, timp de 3—6 luni, duce la o pierdere a imunoreactivităţii de 10—15% (41, 43). Transportul la distanţă se face pe gheaţă carbonică, în containere închise etanş (43). Probele care sosesc decongelate la laborator sînt inutilizabile.

F. *Mediul de incubare.* Se foloseşte ca diluent tampon Tris-HCl, preparat astfel: Tris (hidroximetil-aminometan-HCl) 0,1 M, pH=7,5 cu Trasylol 500 U/ml şi ser uman (de la pacienţi tiroidectomizaţi), pentru o concentraţie finală de 10 ml la 100 ml sistem tampon complet (43). Trasylolul şi serul uman reduc degradarea trasorului.

Incubarea se face în eprubete de sticlă spălate cu amestec oxidant, la 4°C, timp de 2—3 zile cu antiserul şi încă 2—3 zile cu trasorul (42, 43). Probele biologice sînt testate, fiecare, la cel puţin două niveluri de diluţie (43).

G. *Tehnica de separare.* Adsorbţia pe particule de cărbune-dextran suspendate în tampon borat 0,14 M, pH=8,0, este folosită în mod curent (43, 45). Cromatoelectroforeza serveşte ca tehnică de referinţă (40).

H. *Performanţele sistemului RIA*

Specificitatea. Sistemul RIA pentru calcitonină umană este strict specific pentru CT nativă umană, calcitoninele altor specii nu interferează în sistem nici la concentraţii cu 3—4 ordine de mărime mai mari (43). Totuşi, unele seruri anti-CT umană dau reacţii încrucişate cu CT de şobolan. Alţi hormoni polipeptidici ca HGH, h-Pth, insulina, glucagonul, ACTH, AVP sau extractele din diferite ţesuturi umane nu interferează în sistemul RIA pentru CT umană (41, 42, 43, 45).

Activitatea imunologică şi biologică. Există o bună corelaţie între valorile CT obţinute prin RIA, exprimate în ng/ml şi cele obţinute prin dozare

Scanned with OKEN Scanner

biologică, exprimate în mU-MRC/ml. De menţionat că echivalentul de masă al unităţii MRC nu este încă acelaşi pentru toate laboratoarele; se echivalează de exemplu 1 ng CT umană cu 0,3 mU-MRC (43). Valorile obţinute prin biodozare tind să fie cu 20—65% mai mari decît cele obţinute prin imunodozare, în special la concentraţii mai mari de 50-mU-CT-MRC/ml (41, 43). Concordanţa între imunoactivitate şi bioactivitate este valabilă numai pentru ser şi ţesut; în urina ca atare şi în concentratele de urină, valorile CT obţinute prin cele două metode sînt discrepante şi anume cele furnizate de RIA sînt mult mai mari (43, 48).

Sensibilitatea. Cantitatea minimă detectabilă este de 50—100 pg/ml ser, dar concentraţiile sub 1 ng cad într-o zonă de incertitudine, valorile din această zonă putînd fi însă asigurate prin dozări repetate şi la mai multe diluţii sau prin folosirea cromatografiei de afinitate (43).

Exactitatea. Valorile crescute ale CT după pentagastrină, dispariţia CT din circulaţie la bolnavii tiroidectomizaţi atestă că ceea ce se măsoară este CT.

Precizia. Variabilitatea intraserie, calculată din multiple replicate ale aceleiaşi diluţii, este sub 25% (coeficient de variabilitate), iar cea interserii, calculată din repetarea aceleiaşi probe conservată la —70°C şi măsurată pe un interval de 3—6 săptămîni, este sub 25%.

9.3.4. ASPECTE CLINICE

A. *Indicaţii pentru măsurarea CT*

Sensibiltatea RIA pentru CT nu este suficientă pentru a măsura variaţiile hormonului în condiţii fiziologice şi nici nu se poate pune un diagnostic de „deficit" de CT.

— Pentru diagnosticul de *carcinom medular tiroidian* se prelevează probe de sînge şi de urină în condiţii bazale.

— Pentru *screening*, cu scopul de a exclude diagnosticul de carcinom medular la membrii unei familii cu *cromafinomatoză familială* (carcinom medular ereditar asociat cu feocromocitom), se recoltează probe în condiţii bazale şi în cursul testelor dinamice de încărcare cu calciu sau de stimulare cu alcool.

— Pentru urmărirea rezultatelor terapeutice în carcinomul medular, se practică prelevări serice de probe biologice.

— CT mai poate fi crescută în o serie de afecţiuni tumorale, printre care cancerul mamar.

B. *Probe dinamice*

Proba de încărcare cu calciu: se perfuzează timp de 4 ore calciu gluconic în doze de 15 mg/kilocorp (49).

Proba de încărcare cu EDTA produce o scădere a CT la normali (46, 50).

Proba la *alcool:* se administrează *per os*, la adulţi, 50 ml alcool (de 40°) şi se recoltează probe de sînge înainte şi la 3, 10, 15 şi 30 de minute de la ingestie.

Proba la pentagastrină: se injectează i.v. în 20 secunde, 0,5 μg pentagastrină/kilocorp; se recoltează probe înainte, la 2 şi 5 minute de la injecţie (51).

Scanned with OKEN Scanner

C. *Rezultate*

În condiții fiziologice, concentrația CT, în probe de sînge prelevate dimineața pe nemîncate, este sub 100 pg/ml, la peste 75% din persoanele normale, și între 100 și 250 pg/ml, la restul de 25% (41, 43). Aceste valori sînt numai orientative, deoarece există diferențe între rezultatele diferitelor laboratoare.

În urină, concentrația CT este sub 1 ng/ml.

Concentrația CT crește în serul mamei și al fătului la termen (48, 49).

În condiții patologice. La pacienți cu tiroidectomie totală, CT nu este detectabilă. În carcinomul medular tiroidian, concentrația CT în ser și în urină este mult crescută, observîndu-se valori între 1 și peste 1 000 ng/ml ser. Tumoarea răspunde la diferite substanțe secretagoge (calciu, pentagastrină, glucagon), de aceea se recomandă control prin probe bazale și după teste de stimulare. Există o corelație directă pozitivă între nivelul bazal al CT în ser și mărimea tumorii. În plus, cu ajutorul probei de încărcare cu calciu se poate identifica faza premalignă hiperplazică a bolii la persoane genetic predispuse (52). Măsurarea CT, ca marcher tumoral, în condiții bazale și după probe de stimulare precizează diagnosticul de tumoare precum și eficiența terapeutică (53, 54, 55).

Alte situații patologice în care se semnalează creșterea concentrației CT: tumori carcinoide, sindrom Zollinger-Ellison, anemie pernicioasă, insuficiența renală acută și cronică.

S-a semnalat și secreție ectopică a CT în țesuturile tumorale care nu derivă din celulele „C", printre care unele tumori pulmonare maligne (43, 48, 56, 57).

BIBLIOGRAFIE

1. **Rasmussen H.** — În: „Textbook of Endocrinology" (editat de R. H. Williams) ed. V Saunders, Company, W. B., Philadelphia, 1974, p. 680—773.
1 bis. **Gozariu L., Dascălu Rodica** — Calciul în organismul uman; Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1975, p. 227.
2. **Collip J. B.** — J. Biol. Chem., 1925, *63*, 395.
3. **Aurbach G. D.** — Endocrinol., 1959, *64*, 296.
4. **Woodhead J. S., O'Riordan J. L. H., Keutmann H. T., Stolz M. L., Lawson B. F., Niall H. D., Robinson C. J., Potts J. T.** — Biochemistry, 1971, *10*, 2 787.
5. **O'Riordan J. L. H., Potts J. T., Aurbach G. D.** — Endocrinol., 1971, *89*, 234.
6. **Brewer H. B., Fairwell T., Ronan R., Sizemore G. W., Arnaud C. D.** — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., *69*, 3 585 (1972).
7. **Niall H. D., Sauer R. T., Jacobs J. W., Keutmann H. T., Segre G. V., O'Riordan J. L. H., Aurbach G. D., Potts J. T. Jr.** — Proc. nat. Acad. Sci (Wash.), 1974, *71*, 384.
8. **Keutmann H. T., Niall H. D., Jacobs J. W., Barling P. M., Hendy G. N., O'Riordan J. L. H., Potts J. T. Jr.** — În: „Calcium Regulating Hormones", (editat de R. V. Talmage, M. Owen și J. A. Parsons), Excerpta med. (Amst.), 1975, p. 9.
9. **Hendy G. N., O'Riordan J. L. H.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York, 1977, p. 425.
10. **Kemper B., Habener J. F., Potts J. T., Rich A.** — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1972, *69*, 643.
11. **Cohn D. V., Mac Gregor R. R., Chu L. H., Kimmel J. R., Hamilton J. W.** — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1972, *69*, 1 521.
12. **Frieden E. H.** — Chemical Endocrinology, Academic Press Inc., New York, 1976, p. 96.
13. **Tashjian A., Levine L., Munson P. L.** — Endocrinol., 1964, *74*, 244.
14. **Berson S. A., Yalow R. S., Aurbach G. D., Potts J. T. Jr.** — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, *49*, 613.

Scanned with OKEN Scanner

15. **Reiss E., Canterbury J. M.** — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1968, *128*, 501.
16. **Deftos L. J., Potts J. T.** — Brit. J. Hosp. Med., 1969, *11*, 1 813.
17. **Arnaud C. D., Taso H. S., Littledike T.** — J. Clin. Invest., 1971, *50*, 21.
18. **O'Riordan J. L. H., Watson L., Woodhead J. S.** — Clin. Endocrinol., 1972, *1*, 149.
19. **Deftos L. J.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe şi H. R. Behrman) Academic Press Inc. New York, 1974, p. 231.
20. **Fischer J. A., Binswanger U., Dietrich F. M.** — J. Clin. Invest. 1974, *54*, 1 382.
21. **Barling P. M., Hendy G. N., Evans M. C., O'Riordan J. L. H.** — J. Endocrinol., 1975, *66*, 307.
22. **Berson S. A., Yalow R. S.** — J. Clin. Endocr., 1968, *28*, 1 037.
23. **Segre G. V., Habener J. F., Powell D., Tregear G. W., Potts J. T. Jr.** — J. Clin. Invest., 1972, *54*, 3 163.
24. **Yalow R. S.** — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 1, p. 3—21.
25. **Yalow R. S., Berson S. A.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson şi R. S. Yalow), Noord-Hollandsche Uitgevers-Mij, Amsterdam C., N. Z., 1973, vol. 2 B, p. 969.
26. **Murray T. M., Keutmann H. T.** — J. Endocrinol., 1973, *56*, 493.
27. **Yalow R. S., Berson S. A.** — Nature (Lond.), 1966, *212*, 357.
28. **Niall H. D., Keutmann H. T., Sauer R., Hogan M., Dawson B., Aurbach G. D., Potts J. T. Jr.** — Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 1970, *351*, 1 586.
29. **Addison G. M., Hales C. N., Woodhead J. S., O'Riordan J. H. L.** — J. Endocrinol., 1971, *49*, 521.
30. **Tomlinson S., Clemens V. R., Smith M. J. G., Kendall B. E., O'Riordan J. L. H.** — Brit. J. Surg., 1974, *61*, 633.
31. **Melvin K. E. W., Miller H. H.** — New. Engl. J. Med., 1971, *285*, 1 115.
32. **Riniker B., Neher R., Maier R., Kahnt F. W., Byfield P. G. H., Gudmunssen T. V., Galante L., Mac Intyre I.** — Helv., Chim. Acta., 1968, *51*, 1 738.
33. **Dietrich F. M., Rittel W.** — Nature (Lond.), 1970, *225*, 75.
34. **Byfield P. G. H., Clark M. B., Turner K., Foster G. V., Mac Intire I.** — Biochem. J., 1972, *127*, 199.
35. **Hirsch P. F., Voelkel E. F., Munson P. L.** — Science, 1964, *146*, 412.
36. **Cooper C. W., Hirsch P. F., Tovernd S. V., Munson P. L.** — Endocrinol., 1967, *81*, 610.
37. **Laljee H. C. R., Smith R. N., Dorrington K. J.** — J. Endocrinol., 1967, *39*, 507.
38. **Deftos I. J., Lee M. R., Potts J. T. Jr.** — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S, 1968, *60*, 293.
39. **Deftos I. J.** — Metabolism, 1971, *20*, 1 122.
40. **Tashjian A. H. Jr.** — Endocrinol., 1969, *84*, 140.
41. **Tashjian A. H. Jr.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson şi R. S. Yalow), North-Holland, Amsterdam, 1973, vol. 2 B, p. 1 010.
42. **Tashjian A. H. Jr., Voelkel E. F.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe şi H. R. Behrman), Academic Press Inc., New York, 1974, p. 199.
43. **Weight D. R., Voelkel E. F., Voelkel A. H., Tashjian A. H. Jr.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker, Inc., New York, 1977, p. 391.
44. **Clark M. B., Byfield P. G. H., Boyd S. W., Foster G. V.** — Lancet, 1969, *2*, 74.
45. **Tashjian A. H. Jr., Howland B. G., Melvin K. E. W., Hill C. S. Jr.** — New Engl. J. Med., 1970, 283, 890.
46. **Heynen G., Franchimont P.** — Europ. J. Clin. Invest., 1974, *4*, 213.
47. **Voelkel E. F., Tashjian A. H. Jr.** — J. Clin. Endocr., 1971, *32*, 102.
48. **Tashjian A. H. Jr., Melvin K. E. W., Voelkel E. F., Howland B. G., Zuckerman J. E., Minkin C.** — În: „Calcium, Parathyroid Hormone and the Calcitonins" (editat de R. V. Talmage şi P. L. Munson), Excerpta Medica, Amsterdam, 1972, p. 97.
49. **Tashjian A. H. Jr., Wolfe H. J., Voelker E. F.** — Amer. J. Med., 1974, *56*, 840.
50. **Silva O. L., Snider R. H., Becker K. L.** — Clin. Chem., 1974, *20*, 337.

Scanned with OKEN Scanner

51. **Hennessy J. F., Gray T. K., Cooper C. W., Ontjes D. A.** – J. Clin. Endocr., 1973, *36*, 200.
52. **Wolfe J. J., Melvin K. E. W., Cervi-Skinner S. J., Saadi A. A. Al., Juliar J. F., Jackson C. E., Tashjian A. H. Jr.** — New Engl. J. Med., 1973, *289*, 437.
53. **Melvin K.E.W., Miller H. H., Tashjian A. H. Jr.** — New. Engl. J. Med., 1973, *285*, 1 115.
54. **Jackson C. E., Tashjian A. H. Jr., Block M. A.** — Ann. Intern. Med., 1973, *78*, 845.
55. **Goltzman D., Potts J. T. Jr., Ridgeway E. C., Malooy F.** — New Engl. J. Med., 1974, *290*, 1 035.
56. **Coombes R. C., Hillyard C., Greenberg P. B., Mac Intyre I.** — Lancet, 1974, *1*, 1 080.
57. **Becker K. L., Silva O. L., Doppman J., Primack A., Snider R. H.** — Clin. Res., 1975, *23*, 41A.

Scanned with OKEN Scanner

10

HORMONII GASTROINTESTINALI

Polipeptidele, cu activitate hormonală, secretate de celulele endocrine ale mucoasei stomacului şi intestinului subţire sînt cunoscute sub numele de hormoni gastrointestinali (tabelul II.10.1). Aceşti hormoni participă la stimularea, inhibiţia şi reglarea activităţilor motorie şi secretorie a unei varietăţi de organe printre care stomacul, intestinul subţire, ficatul, tractul biliar şi pancreasul.

Tabelul II.10.1.

Hormonii gastrointestinali

Hormonul	Locul de sinteză (sursa)	Funcţia principală
Gastrina	antrum gastric: celule „G"	stimulează secreţia gastrică
Secretina	duoden, jejun celulele „S"	stimulează secreţia pancreatică de apă şi bicarbonat
Colecistokinina-pancreozimina (CCK-PZ)	duoden, jejun	stimulează contracţia veziculei biliare şi secreţia enzimatică a pancreasului
		inhibă activitatea gastrinei
Urogastrina	urină	inhibă secreţia gastrică de HCl
Enterogastrina	intestinul subţire	inhibă secreţia acidă şi golirea gastrică
Bulbogastrona	porţiunea iniţială a duodenului	înhibă secreţia gastrică mediată de gastrină
Polipeptidul gastric inhibitor (GIP)	intestinul subţire	inhibă motilitatea şi secreţia gastrică
Enteroglucagonul (GLI)	intestinul subţire	stimulează secreţia insulinei
Peptidul vaso-inhibitor (VIP)	intestinul subţire	vasodilataţie sistemică, hipotensiune, creşte debitul cardiac, stimulează respiraţia, creşte glicemia

Cei mai importanţi hormoni gastrointestinali sau digestivi sînt gastrina, secretina şi colecistokinina-pancreozimina. Există, în prezent, suficiente date asupra structurii, activităţii biologice, asupra mecanismelor de reglare, a

Scanned with OKEN Scanner

relaţiilor neuroumorale şi asupra participării lor la fenomenele patologice (1, 2). Descoperirea secretinei şi a gastrinei în primii ani ai acestui secol a influenţat şi modificat conceptul de glandă endocrină şi a deschis calea studiului mesagerilor chimici (1). Dealtfel, Brown-Séquard afirma că fiecare organ, fiecare ţesut, fiecare celulă, are o secreţie internă. C. I. Parhon atrăgea atenţia că mucoasa bucală şi cea esofagiană ar putea secreta substanţe hormonale ca şi mucoasa gastrică şi intestinală (3).

10.1. GASTRINA

10.1.1. INTRODUCERE

A. *Chimia gastrinelor.* Descoperită în 1905 (4), gastrina este secretată de mucoasa *antrum*-ului gastric. Abia în ultimele două decenii tehnica chimică a permis izolarea şi caracterizarea gastrinelor. Au fost izolate gastrina I şi II din mucoasa gastrică de porc şi s-a precizat că este vorba de două polipeptide cu 17 aminoacizi (heptadecapeptide), care diferă între ele prin aceea că gastrina II conţine în poziţia 12 tirozină-sulfat, iar gastrina I tirozină nesulfatată (5). Astăzi este cunoscută secvenţa aminoacizilor gastrinei unei varietăţi de mamifere, inclusiv omul (6).

Cele două gastrine I şi II au activitate biologică comparabilă, porţiunea moleculară cea mai activă aparţinînd unui tetrapeptid plasat la capul carboxi-terminal (7). Pentagastrina este un peptapeptid de sinteză care conţine tetrapeptidul C-terminal al gastrinei (fig. II.10.1); ea este folosită pentru studiile de farmacologie clinică şi experimentală. Deşi influenţa gastrinei asupra reglării secreţiei acide a stomacului este demonstrată la om şi la alte mamifere, faptul că rezultatele sînt obţinute cu doze farmacologice de hormon face dificilă aprecierea rolului său fiziologic (1, 8).

Ambele grupări terminale ale gastrinelor heptadecapeptide sînt blocate: gruparea amino prin condensarea piroglutamil şi gruparea carboxil prin amidizare.

Gastrine umane	1	2	3	4	5	6	7	8
I	(Piro) Glu	— Gli	— Pro	— Trp	— Leu	— Glu	— Glu	— Glu —
II								
Pentagastrina								
Tetrapeptid								

Fig. II.10.1. — Structura primară a

Gastrina heptadecapeptid posedă o încărcare puternic negativă, dată de abundenţa acizilor dicarboxilici, ceea ce duce la migrarea electroforetică puternic anodică şi adsorbţia pe răşini schimbătoare de anioni. S-a demonstrat însă că fracţiunea majoră a gastrinei circulante este o moleculă mai bazică

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.10.2.

Efectele hormonale ale gastrinei

	Efectul	Organul țintă
Stimulează	secreția acidă (de 1 500 × mai activă ca histamina, pe baze molare)	stomac
	secreția electroliților	stomac
	secreția apei	pancreas glandele Brunner
	secreția enzimatică	pancreas
	creșterea masei mucoasei	stomac
	fluxul sanguin în: artera mezenterică superioară, în mucoasa gastrică, pancreas, intestinul subțire	aparat cardiovascular?
	eliberarea insulinei	pancreas
	eliberarea secretinei	stomac și indirect, prin secreția acidă, duodenul
Inhibă	absorbția sodiului din ileon	ileon?

— contractă: mușchiul neted al sfincterului esofagian inferior, din stomac, intestinul subțire și gros, vezicula biliară, uter.
— relaxează: sfincterul Oddi.

și mai mare decît heptadecapeptidul gastric (9, 10, 11). Gastrina circulantă are greutatea moleculară de aproximativ 7 000 față de 2 100 daltoni pentru heptadecapeptid. Această gastrină circulantă a fost numită *big gastrina* (BG) și este alcătuită dintr-un peptid cu GM de 5 000 atașat la capul N-terminal al heptadecapeptidului. Se pare că în plasmă și în mucoasa jejunală există o formă moleculară de gastrină încă mai mare, numită *big-big gastrina* (BBG) (12).

B. *Activitatea biologică.* Gama acțiunilor biologice ale hormonilor digestivi cuprinde acțiuni distincte fiecărui hormon, dar și acțiuni comune, sinergice, de exemplu cu colecistokinina-pancreozimina. *Situs*-urile receptoare ale gastrinei și secretinei sînt totuși distincte.

O parte din acțiunile gastrinei (tabelul II.10.2) sînt de tip farmacologic, ca de exemplu acțiunea asupra veziculei biliare. Lipsa datelor privind relația doză-răspuns nu permite clasificarea acțiunilor gastrinei în fiziologice și farmacologice; în plus, unele efecte diferă cu specia (8).

9 10 11 12 13 14 15 16 17

Glu — Glu — Ala — Tir — Gli — Trp — Met — Asp — Fe — NH_2

Tir
|
SO_3

— Ala — Trp — Met — Asp — Fe — NH_2

Trp — Met — Asp — Fe — NH_2

gastrinelor naturale și de sinteză.

C. *Reglarea secreției gastrinei.* Reglarea secreției gastrice prin stimulare vagală și prin gastrină nu pot fi separate (tabelul II.10.3.). Eliberarea gastrinei pare să fie dependentă de ionii de calciu, ceea ce ar explica de ce bolnavii cu hipercalcemie au concentrații crescute de gastrină în sînge.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 11.10.3.

Reglarea secreţiei gastrice prin stimulare vagală

Stimularea vagală produce:	Gastrina
Stimularea colinergică directă a glandelor acidosecretoare; eliberarea colinergică a gastrinei din glandele pilorice; — Vagotomia produce: scăderea răspunsului glandelor acidosecretoare la gastrină	stimulează secreţia acidă creşte răspunsul glandelor acidosecretoare la stimularea vagală directă — Antrectomia produce: scăderea răspunsului la stimularea vagală directă

10.1.2. METODE DE CANTIFICARE

Sînt utilizate metodele *in vivo:* cîini sau pisici neanesteziaţi (13, 14) sau anesteziaţi (15), la care au fost secţionaţi nervii vag şi splanhnic, primesc injecţii s.c. sau i.v. de gastrină şi se măsoară producţia de acid la intervale prestabilite. Alte metode folosesc înregistrarea continuă a pH-ului gastric. Pentru ameliorarea variabilităţii rezultatelor, stomacul este perfuzat.

Metoda nu permite urmărirea concentraţiei gastrinei în lichidele biologice; are utilitate numai pentru testarea preparatelor de gastrină naturală sau sintetică. Dezvoltarea tehnicilor RIA pentru gastrină (11, 16, 17, 18, 19, 20) permite noi clarificări în domeniul implicaţiilor fiziopatologice ale hormonului, dar şi în ceea ce priveşte formele moleculare circulante de tip BG şi BBG.

10.1.3. RADIOIMUNOANALIZA GASTRINEI

A. *Imunogenul.* Sînt folosite preparate naturale adsorbite pe particule de latex încărcate electropozitiv (18) sau cuplate covalent cu albumină (20). Antiseruri utile pentru RIA sînt obţinute de asemenea cu gastrină sintetică — hexadecapeptid (secvenţa 2—17) cuplată covalent cu albumină (17) sau heptadecapeptid cuplat cu albumină (21).

B. *Antiserul.* Iepuri injectaţi cu conjugate hexadecapeptid-albumină în adjuvant Freund produc antiseruri cu diluţia de lucru de 1 : 10 000—1 : 20 000.

C. *Trasorul.* Gastrina sintetică (secvenţa 1—17) este marcată cu ^{125}I prin metoda cu cloramina-T. Amestecul de marcare este purificat pe Sephadex G-10 (17, 21) sau pe gel de amidon (19). Purificarea pe Sephadex are avantajul că este simplă şi rapidă, dar nu separă gastrina cu zero, unu şi doi atomi de iod, pe cînd electroforeza pe gel de amidon separă gastrina monoiodurată de cea diiodurată, dar este laborioasă (22). În exces de antiser, procentul radioactivităţii legate nu trece de 70%, chiar cînd purificarea se face pe coloană de aminoetilceluloză AE-41 (21).

D. *Standardul.* Sînt folosite mai multe preparate de referinţă, de aceea rezultatele diferă între laboratoare. Gastrina I umană sintetică este un preparat adecvat, dar activitatea diferitelor loturi este variabilă. De aceea se recomandă să se calculeze activitatea pe bază molară, măsurînd adsorbţia la 280 mm cu un coeficient de extincţie molară de 12 700 (21). Preparate naturale de gastrină porcină I şi II sînt furnizate de Medical Research Council (MRC), Anglia.

Scanned with OKEN Scanner

Gama concentraţiilor din preparatul standard introduse în sistemul RIA pentru curba de referinţă depinde de sensibilitatea sistemului. Sînt folosite de exemplu concentraţii între 50 şi 1 000 pg/ml, adică 5—100 pg/eprubetă.

Soluţia mamă de gastrină sintetică umană se prepară în bicarbonat de amoniu 0,05 M la o concentraţie de 1 μg/ml şi se conservă la —20°C. Înainte de folosire, hormonul este diluat în tampon Veronal 0,025 M, pH=8,6.

E. *Probele biologice*

a) *Sînge*

— Condiţii bazale: dimineaţa pe *nemîncate*, după 8—10 ore de repaus, se recoltează 8—10 ml sînge în eprubete de plastic. Se lasă să coaguleze şi se centrifughează în cupe de plastic. Se separă serul şi se conservă în eprubete de plastic la —20°C. Este preferabil să se recolteze două probe la interval de 20 de minute. Două zile înainte nu se administrează anticolinergice şi nici antiacide cu calciu. Pe biletul de însoţire se notează calcemia şi ureea sanguină.

— *Probe dinamice*. Pentru diferenţierea hiperplaziei gastrice de tumoare care secretă gastrină se face proba la secretină. Se injectează i.v. 75 unităţi de secretină şi se recoltează probe la intervale de 10 minute, începînd cu 20 de minute înainte de injecţie şi continuînd încă 60 de minute, deci în total 9 probe. Creşterea gastrinei sugerează tumoare (sindrom Zollinger-Ellison), pe cînd scăderea sugerează hiperplazia celulelor G ale antrului gastric.

b) *Alte lichide biologice*. Gastrina poate fi măsurată prin RIA în salivă, suc gastric, bilă, suc pancreatic şi în urină. Înainte de conservare la —20°C, este bine ca aceste lichide să fie fierte.

c) *Ţesuturi*. Se cîntăresc, se toacă mărunt şi se fierb 30 de minute în soluţie fiziologică de NaCl. După centrifugare şi filtrare, supranatantul este conservat la —20°C, pînă la folosire. Rezultatele sînt exprimate în ng sau μg per unitate de greutate a ţesutului (21).

F. *Condiţii de incubare*. Mediul de incubare este tampon fosfat la pH=7,4, cu albumină 5 g/l sau tampon veronal 0,025 M, pH=8,6 cu albumină, mertiolat şi eventual, neomicină 20 mg/l (21). Probele sînt incubate în eprubete din polistiren, la rece, timp de 48—72 de ore.

Dacă sistemul RIA nu este suficient de sensibil pentru a detecta concentraţii mici de gastrină, se pot adăuga volume de ser mai mari decît cele uzuale, deoarece proteinele serice nu interferează în sistem. Cînd concentraţia gastrinei este mare, se recurge la diluarea probei.

G. *Tehnica de separare:* majoritatea laboratoarelor folosesc tehnica de adsorbţie a radioactivităţii libere pe cărbune-dextran.

H. *Performanţele sistemului RIA*

Specificitatea. Peptide chimic neînrudite ca HCG, secretina, angiotensina, LH, insulina şi glucagonul nu interferează în sistem. *Peptide înrudite şi fragmente:* gastrina I sintetică umană secvenţa 2—17, gastrina naturală porcină I şi II şi fragmentul 11—17 reacţionează cu antiserul deplasînd trasorul, ca şi gastrina I sintetică umană secvenţa 1—17. Este interesant că unele antiseruri fac distincţia între gastrina I şi gastrina II porcină. Fragmentele 14—17 şi 1—13, ca şi colecistokinina, nu interferează practic în sistem (21). Nu s-a studiat cantitativ interferenţa BG şi a BBG în sistemul RIA pentru gastrină.

Scanned with OKEN Scanner

Sensibilitatea este de 2,5—5,0 pg/ml, calculată ca o valoare a lui x care corespunde punctului în care $\frac{DS(x)}{x} = 0{,}5$. Acest punct reprezintă aproximativ 2 DS față de punctul zero și are un nivel de semnificație cu P=0,025 (21).

Precizia este calculată ca coeficient de variabilitate intra- și interserie pentru trei niveluri de doze. Se înregistrează coeficienți de 4% intra- și 10% interserii în zona dozelor mici și mari și ceva mai mici în zona dozelor medii.

Exactitatea este asigurată prin:

— repetarea dozării într-o probă de ser cu concentrație cunoscută;

— prin proba de recuperare a unor cantități cunoscute;

— comparînd curbele date de preparatul de referință cu cele date de seruri cu valori mari ca de exemplu sindromul Zollinger-Ellison.

I. *Probleme.* Metoda RIA pentru cantificarea gastrinei evoluează continuu în sensul ameliorării specificității antiserurilor și a producției antiserurilor pentru formele macromoleculare și pentru fragmente.

10.1.4. APLICAȚII CLINICE ȘI REZULTATE

A. *Fiziologie.* Valorile obținute de diferite laboratoare pentru concentrația gastrinei la persoane sănătoase în condiții bazale sînt diferite. Diferențele sînt generate de heterogenitatea formelor moleculare ale gastrinei în ser, de dominanta de recunoaștere a anticorpilor pentru diferitele gastrine și de diferențele între preparatele standard.

a) *Condiții bazale*

Concentrația gastrinei la normali în condiții bazale variază între zero și 160 pg/ml sau zero — 80 pmol/l în termeni de gastrină umană I, cu o medie între 20 și 40 pg/ml (10—20 pmol/l); 95% dintre normali au concentrații sub 100 pg/ml (50 pmol/l).

b) *Probe dinamice*

— După un prînz cu proteine, gastrina crește cu 50—300%, cu un maximum între 15 și 45 de minute după ingestie. Injecția prealabilă de 0,6 mg atropină i.m. crește încă mai mult concentrația gastrinei prin acțiunea combinată a scăderii inhibiției acide cu creșterea timpului de golire gastrică (11, 21, 23, 24).

— Stimularea vagului prin *hipoglicemie insulinică* crește de asemenea concentrația gastrinei în ser dar răspunsul este variabil și mai puțin accentuat.

— Neutralizarea secreției acide prin administrarea orală a substanțelor alcaline nu influențează semnificativ concentrația gastrinei serice bazale dar exacerbează răspunsul la ingestia proteinelor și la hipoglicemia insulinică (52, 26).

B. *Patologie.* Cantificarea gastrinei plasmatice are valoare diagnostică numai în cazul unui sindrom rar, sindromul Zollinger-Ellison, produs de gastrinom, o tumoare a insulelor pancreasului, secretoare de gastrină.

Valori ale gastrinei serice bazale peste 300—500 pg/ml sînt considerate ca patologice (21). În tabelul II.10.4 sînt prezentate diferitele cauze ale hipergastrinemiei.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
His—	Ser—	Asp—	Gli—	Tr—	Fe—	Tr—	Ser—	Glu—	Leu—	Ser—	Arg—	Leu—	Arg—

Fig. II.10.2. Structura primară

Scanned with OKEN Scanner

Diagnosticul diferenţial se pune cu ajutorul probelor dinamice la secretină, calciu, proteine (21).

În *ulcerul duodenal* concentraţia gastrinei în condiţii bazale este în limite normale (cu rare excepţii), dar răspunsul la ingestia proteică şi la hipoglicemia insulinică este exacerbat, ceea ce ar sugera creşterea masei gastrice gastrinosecretoare.

Tabelul II.10.4.

Cauze ale hipergastrinemiei (referinţa 21)

Secreţia gastrică	Entitatea nosologică
Hiperaciditate gastrică	sindrom Zollinger-Ellison, antrul gastric exclus dar menţinut, hiperplazia celulelor gastrice antrale artrita reumatoidă, insuficienţa renală cronică gravă gastrită atrofică cronică tip A (gastrită limitată la mucoasa fundică şi a corpului cu antrul normal)
Secreţie acidă variabilă	
Aclorhidrie	

Vagotomia pentru ulcer duodenal este urmată de hipergastrinemie moderată *à jeun.*

Antrectomia determină scăderea gastrinei serice.

Gastrita banală (*tip B*), în care mucoasa gastrică este afectată în totalitate, se asociază cu concentraţii normale sau scăzute ale gastrinei serice bazale.

Ulcerul gastric şi carcinomul de corp gastric se asociază cu hipergastrinemie moderată *à jeun*, probabil, datorită scăderii sau absenţei secreţiei acide — inhibitorul natural al eliberării gastrinei (21).

Gastrinomul (sindrom Zollinger-Ellison) se asociază cu valori bazale ale gastrinei serice de la 200 pg/ml la peste 2 000 pg/ml (100—1 000 pmol/l).

10.2. SECRETINA

10.2.1. INTRODUCERE

Secretina este primul hormon digestiv descoperit (27). Hormonul a fost izolat din mucoasa duodenală şi jejunală (28), a fost purificat, s-a determinat structura chimică (29) şi există ca preparat de sinteză (30). Cu ajutorul tehnicii de imunofluorescenţă, producţia secretinei umane a fost localizată în mucoasa duodenului şi a primei porţiuni a jejunului, în celulele numite celule „S" (31).

Secretina porcină are structura unui lanţ polipeptidic cu 27 acizi aminaţi (fig. II.10.2). De remarcat că 14 din cele 27 reziduuri sînt comune cu ale glucagonului pancreatic, aspect structural care se reflectă în similitudinea acţiunilor biologice ale celor doi hormoni. Pentru manifestarea activităţii

15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
—Asp—Ser—Ala—Arg—Leu—Gln—Arg—Leu—Leu—Gln—Gli—Leu—Val—NH_2

a secretinei porcine.

Scanned with OKEN Scanner

biologice (tabelul II.10.5.) este necesară întreaga moleculă. Administrarea secretinei este folosită ca test dinamic pentru investigarea funcţiei exocrine a pancreasului: la pacienţi cu pancreatită cronică distructivă nu creşte secreţia de bicarbonat, iar la cei cu carcinom nu creşte volumul secreţiei pancreatice. Deoarece secretina neutralizează conţinutul bulbului duodenal prin stimularea secreţiei bicarbonatului în pancreas se încearcă folosirea ei în terapia ulcerului duodenal (1).

Ionii de hidrogen reprezintă unicul stimulator cunoscut al eliberării secretinei din mucoasa intestinului subţire superior.

Tabelul II.10.5.

Efectele hormonale ale secretinei

	Efectul	Organul ţintă
stimulează	secreţia bicarbonatului secreţia enzimatică eliberarea insulinei	pancreas
	secreţia apei şi bicarbonatului	— conductele biliare intra- şi extrahepatice — glandele Brunner
	secreţia pepsinei	stomac
creşte	fluxul pancreatic postprandial	pancreas
inhibă	secreţia acidă eliberarea gastrinei	stomac
	contracţia muşchiului neted	stomac intestin subţire şi gros
reduce	absorbţia apei şi sodiului	ileon vezicula biliară
promovează	lipoliza prin activarea adenilciclazei	ţesut gras

relaxează sfincterul Oddi;
exacerbează contracţiile veziculei biliare induse de CCK-PZ şi gastrină.

10.2.2. METODE DE CANTIFICARE

Metodele biologice iniţiale se bazează pe măsurarea fluxului secretor pancreatic la animale cu conductul pancreatic canulat.

Tehnica introdusă în 1928 de Hammersten se bazează pe titrarea alcalinităţii în sucul pancreatic colectat în interval de 15 minute după injecţia i.v. de secretină la pisica anesteziată. O unitate pisică (HCU = *Hammersten Cat Unit*) este definită ca acea cantitate de secretină necesară să stimuleze secreţia a 0,01 mEq de bicarbonat. Secretina purificată conţine 80 000—400 000 HCU/mg, de unde rezultă că sensibilitatea tehnică este de 2—10 ng de secretină (32).

Primul sistem RIA adecvat pentru secretină este realizat în 1972 (33), urmînd apoi sisteme încă mai sensibile şi reproductibile (34, 35, 36).

Scanned with OKEN Scanner

10.2.3. SISTEM RIA PENTRU CANTIFICAREA SECRETINEI

A. *Imunogenul.* Se folosesc două tipuri de preparate: conjugate de secretină-albumină şi secretină adsorbită pe cărbune (36).

B. *Antiserul.* Iepurii imunizaţi produc anticorpi cu titruri de peste 1 : 20 000 şi constante de afinitate de ordinul a 10^{11} l/mol. Antiserurile se conservă în diluţii de 1 : 10, cu ser normal de iepure, la —20°C, ca atare sau liofilizat.

C. *Trasorul radioactiv.* Secretina nu conţine nuclee tirozinice, dar iodurarea se poate face prin metoda cu cloramina-T la nucleul histidinic prezent în poziţia 1 (fig. II.10.2.) (37, 38). Reacţia se face în eprubete de plastic, iar purificarea secretinei iodurate se face cu talc (39).

Puritatea hormonului marcat se face prin cromatoelectroforeză.

D. *Standarde.* Secretina sintetică este dizolvată în tampon, la o concentraţie de 1 µg/ml şi se conservă la —20°C (36).

E. *Probele biologice.* Secretina este relativ instabilă în ser, în special din cauza secretinazei. Activitatea imunologică a secretinei plasmatice scade la jumătate, în timp de 60 de ore, cînd este conservată la +4°C chiar dacă este diluată 1:2 cu tampon. De aceea, se recomandă folosirea inhibitorilor de peptidaze de tip Trasylol 1 000 KI—U/ml. Sîngele este colectat în eprubete din plastic heparinate şi răcite, este centrifugat imediat şi conservat la —20°C în eprubete de plastic (se evită sticla deoarece secretina aderă puternic la suprafeţe de sticlă).

F. *Condiţii de incubare.* Mediul de incubare este tampon fosfat 0,01 M, pH=6,5, cu 2,5 g% albumină bovină. Incubarea se face la +4°C.

G. *Tehnica de separare* este adsorbţia fracţiunii libere pe cărbune-dextran.

H. *Performanţele sistemului*

Specificitatea. Hormoni structural înrudiţi ca glucagonul, VIP şi GIP nu interferează în sistemul RIA. O „big secretină" plasmatică cu GM de 100 000 poate interfera în dozarea secretinei (36).

Sensibilitatea. Pot fi detectate cantităţi de 2,5—5 pg/eprubetă, ceea ce corespunde la concentraţii de 12,5—25 pg/ml (3—6 fmol/l).

Precizia intraserie este de aproximativ 12%.

10.2.4. APLICAŢII CLINICE ŞI REZULTATE

Concentraţia secretinei la normali în condiţii bazale este sub 50 pg/ml (36) şi creşte pînă la 300 pg/ml după administrarea intraduodenală de soluţie acidă, 1 meq/minut, timp de 20 de minute.

Absenţa răspunsului secretinei la încărcarea cu glucoză sugerează că hormonul nu este implicat în eliberarea insulinei.

Se anticipează că măsurarea secretinei ar putea avea utilitate diagnostică în sindromul Zollinger-Ellison şi în insuficienţa pancreatică (36).

BIBLIOGRAFIE

1. **McGuigan J. E.** — În: „Textbook of Endocrinology" (editat de R. H. Williams), Ed V, Saunders Company, W. B., Philadelphia, 1974, p. 841.
2. **Thompson J. C.** — Gastrointestinal hormones, University of Texas Press, Austin, 1975.
3. **Parhon C. I.** — „Opere alese", Acad. R.P.R., Bucureşti, 1959, vol. 3, p. 25.

Scanned with OKEN Scanner

4. **Edkins J. S.** — Proc. Roy. Soc. Med., 1905, *76*, 376.
5. **Gregory R. A., Tracy H. J.** — Gut, 1964, *5*, 103.
6. **Beacham J. Bentley P. H.** — Nature (Lond.), 1968, *209*, 585.
7. **Morely J. S., Tracy H. J., Gregory R. A.** — Nature (Lond.), 1965, *207*, 1 356.
8. **Grossman M. I.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow), Noord-Hollandsche Uitgevers-Mij, Amsterdam C. N. Z., 1973, p. 1 034.
9. **Yalow R. S., Berson S. A.** — Gastroenterology, 1970, *58*, 609.
10. **Yalow R. S., Berson S. A.** — Gastroenterology, 1971, *60*, 203.
11. **Yalow R. S., Berson S. A.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow), Noord-Hollandsche Uitgevers, Mij., Amsterdam C., N. Z., 1973, p. 1 043.
12. **Yalow R. S.** — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 1, p. 3.
13. **Uvnäs B., Emäs S.** — Gastroenterology, 1961, *40*, 644.
14. **Emäs S., Uvnäs B.** — În: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow), Nord-Hollandsche Uitevers-Mij., Amsterdam C., N. Z., 1973, p. 1 037.
15. **Blair E. L., Harper A. A., Reed J. D.** — J. Physiol., 1962, *163*, 47.
16. **Odell W. D., Charters C., Davidson W. D., Thompson J. C.** — J. Clin. Endocr., 1968, *28*, 1 840.
17. **McGuigan J. E.** — Gastroenterology, 1968, *54*, 1 005.
18. **Jeffcoate S. L.** — Scand. J. Gastroenterol., 1969, *4*, 457.
19. **Yalow R. S., Berson S. A.** — Gastroenterology, 1970, *58*, 1.
20. **Yip B. S. S. C., Jordan P. H. Jr.** — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1970, *134*, 380.
21. **Hansky J., Soveny C.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker, Inc., New York, 1977, p. 459.
22. **Jaffe B. M., Walsh J. H.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press Inc., New York, 1974, p. 251.
23. **Korman M. G., Soveny C., Hansky J.** — Gut, 1971, *12*, 619.
24. **Walsh J. H., Yalow R. S., Berson S. A.** — Gastroenterology, 1971, *60*, 16.
25. **Hansky J., Korman M. G., Cowley D. J., Baron J. H.** — Gut, 1971, *12*, 959.
26. **Korman M. G., Strickland R. G., Hansky J.** — Gut, 1972, *13*, 349.
27. **Bayliss W. M., Starling E. H.** — J. Physiol., 1902, *28*, 325.
28. **Jorpes J. E., Mutt V.** — Acta chem. scand., 1961, *15*, 790.
29. **Mutt V., Jorpes J. E.** — Pure Appl. Chem., 1966, *14*, 1.
30. **Bodansky M., Ondetti M. A., Levine S. D., Narayanan V. L., von Saltza M., Shechan J. T., Williams N. J., Sabo E. F.** — Chem. Industr., 1966, *42*, 1 757.
31. **Polak J., Coulling I.** — Scand. J. Gastroenterol., 1971, *6*, 739.
32. **Frieden E. H.** — În: „Chemical Endocrinology", Academic Press Inc., New York, 1976, p. 203.
33. **Boden G., Chey W. Y., Dinoso V. P.** — În: „Proc. 4th Intern. Congr. Endocrinol.", Washington, D. C. Ser. No. 256, Excerpta Medica, Amsterdam, (abstr. 177), 1972.
34. **Boden G., Chey W. Y.** — Endocrinology, 1973, *92*, 1 617.
35. **Boden G.** — În: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press Inc., New York, 1974, p. 275.
36. **Byrnes D. J.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcell Dekker, Inc., New York, 1977, p. 483.
37. **Young J. D., Lazarus L., Chisholm J. D.** — J. nucl. Med., 1968, *9*, 641.
38. **Teale J. D., Buchanan K. D., Harper G.** — Gut, 1972, *13*, 849.
39. **Rosselin G., Assan R., Yalow R. S., Berson S. A.** — Nature (Lond.), 1966, *212*, 355.

Scanned with OKEN Scanner

11

TRANZINE HORMONALE, IgE FACTORII REUMATOIZI ȘI SOMATOMEDINELE

Comasarea în același capitol a unor substanțe cu roluri fiziopatologice atît de diferite nu este justificată decît prin unele asemănări tehnice în construirea sistemelor RIA, precum și de sursa lor comună: plasma sanguină. Poate criteriul fiziologic ar fi fost mai adecvat adică tranzinele hormonilor tiroidieni, suprarenali și sexuali să fie tratate odată cu hormonii transportați, iar IgE într-un capitol special cu alergene și anticorpii lor, rămînînd factorii reumatoizi ca un capitol separat.

11.1 TRANZINE ALE HORMONILOR TIROIDIENI

11.1.1. INTRODUCERE

Mai puțin de 1% din totalul T_4 și T_3 circulă în sînge sub formă liberă, restul fiind vehiculat sub formă legată, adică în interacțiune necovalentă cu multe proteine serice. Acest sistem de transport influențează concentrația hormonilor în circulația sanguină și implicit rolul lor fiziologic. Legarea la proteinele sanguine este implicată în destinul extratiroidian al hormonilor tiroidieni.

La om, în transportul hormonilor tiroidieni sînt implicate în mod normal, trei proteine (tabelul II.1.1): o alfa-globulină, cu GM de 55—60 000 și $T_{1/2}$ de $5{,}3 \pm 0{,}4$ zile (TBG = Thyroxine Binding Globulin) care transportă 75% din T_4 și T_3, o prealbumină (TBPA = Thyroxine Binding Prealbumin) care transportă 15% din T_4, nu și T_3, și albumina (TBA = Thyroxine Binding Albumin) care vehiculează restul.

Importanța acestor proteine pentru fiziologie depinde de afinitatea lor pentru T_4, rolul lor principal fiind acela de a reduce concentrația hormonilor tiroidieni liberi. Heterogenitatea funcțională a TBG pune însă unele probleme care urmează să fie rezolvate (1).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.11.1.

Tranzine ale hormonilor tiroidieni

Denumirea	Sursa	Natura	Migrarea electroforetică	Cantitatea per ml ser	Hormonul legat	Interferenţe
TBG	donatori de sînge, gravide, persoane tratate cu estrogeni sau cu inhibitori ai ovulaţiei	glicoproteină acidă cu GM= 55 000— 60 000 T 1/2= 5,3±0,4 zile	alfa sau interalfa globulină lentă şi rapidă	20—40 μg	T_4	D-T_4 T_3
TBPA		glicoproteină cu GM=73 000	prealbumină	280 μg	T_4	Vitamina A
Albumină (TBA)			albumină	40 mg	T_4	T_3

S-a observat că concentraţia TBG circulante fluctuează sub influenţa hormonilor steroizi gonadici, în bolile tiroidiene şi sub influenţa unor factori genetici (2, 3), de aceea este utilă o metodă de dozare convenabilă pentru studii populaţionale ale alterării concentraţiei TBG din circulaţia sanguină. În metoda RIA (4) pentru TBG problema cea mai importantă este izolarea antigenului TBG cît mai pur (5, 6, 7).

11.1.2. RIA TBG

Antigenul este izolat şi purificat pornind de la un amestec de seruri umane; cel mai înalt grad de puritate a fost obţinut prin cromatografia de afinitate (4, 5, 7, 8). Produsele obţinute prin metodele cromatografice uzuale (Sephadex, DEAE-Sephadex) nu sînt omogene (5).

Antiserul se prepară inoculînd la iepure doze de 0,5 mg pentru prima inoculare şi de 0,2 mg pentru rapeluri, în adjuvant Freund.

^{125}I-TBG se obţine prin metoda cu cloramină-T urmată de purificare pe Sephadex G-75 şi repurificare pe G-200 (4). Folosind 1 mCi de ^{125}INa pentru 12 μg TBG, 30 μg de cloramină T cu timp de contact de 2 minute, s-a obţinut un produs convenabil pentru RIA. Activitatea specifică (AS) a fost calculată din datele asupra eficienţei aparatului de măsurare gama, din randamentul de iodurare şi din greutatea moleculară a TBG luată ca 60 000 şi se exprimă în număr de atomi de ^{125}I per moleculă şi în pulsuri pe minut per nanogram de TBG. În amestecul de incubare RIA s-a introdus o concentraţie de 0,003 ng/0,1 ml echivalînd cu 2 000 pulsuri pe minut (4).

Standardul. Concentraţii progresive de TBG foarte pur între 0,5 şi 50 ng/0,1 ml servesc pentru construirea curbei.

Scanned with OKEN Scanner

Incubare și tehnica de separare. În prima incubare la 4°C are loc reacția cu I anticorp, timp de 24 de ore, iar în a doua incubare are loc separarea cu II anticorp anti-IgG de iepure, în aceleași condiții.

Performanțe. Sensibilitatea RIA TBG este de 2—5 ng/ml, de aceea se poate lucra cu cantități foarte mici de ser (sub 10 µl).

Concentrația TBG în ser fiind de ordinul a 20 µg/ml, au fost dezvoltate tehnici imunochimice (9) și electroforetice (10) pentru măsurarea acestor proteine în serul uman.

Specificitatea intra- și interspecie: nu interferează alte proteine serice umane ca albumina, prealbumina (10) și nici TBG din serul de cîine, oaie, vițel, pasăre și capră. TBG de maimuță este aproape identic cu cel uman (3).

11.1.3. APLICAȚII CLINICE ȘI REZULTATE

Concentrația TBG în ser sau plasmă la om suferă modificări sub influențe fiziopatologice și medicamentoase diverse, unele dintre acestea interferînd și la nivelul legării T_4 la TBG (tabelul II.11.2). Cele mai importante surse de fluctuație sînt defectele genetice (2), hormonii gonadici și bolile tiroidei (3). Valorile serice la normali prezintă variații interindividuale procentuale sau cel mult, multiplicative. Există unele variații legate de tehnica folosită de diferiți autori (tabelul II.11.3). Aria aplicațiilor clinice nu este încă precizată. Oricum, RIA poate servi pentru studii populaționale în scopul detectării defectelor genetice ale sintezei TBG.

Tabelul II.11.2.

Surse ale fluctuațiilor concentrației TBG în serul uman și ale legării T_4 la TBG

Concentrația TBG		Legarea T_4 la TBG	
crește	scade	crește	scade
estrogeni	androgeni	albumină	barbiturice
fenotiazine	corticoizi		salicilați
sarcina	anticonvulsivante		anticonvulsivante
hipotiroidia	defecte genetice		fenilbutazona
porfiria acută la femei	hipertiroidie		acidoză decompensată
	boala Cushing		
	acromegalie		boli grave

Se întrevede că TBG nu este numai un rezervor pentru schimbul rapid al T_4 între compartimentul plasmatic și cel intracelular ci parte din complexele TBG-T_4 ar fi transportate activ transmembrană (1). Dacă ar fi așa, ar însemna că TBG nu are numai un rol static de proteină de legare ci ar fi implicată în reglarea biodisponibilității T_4 pentru transformarea intracelulară. Drept consecință, concentrația TBG și alterările caracteristicilor sale de legare ar putea modifica biodisponibilitatea iodotironinelor. Există tendința de a aprecia *status*-ul tiroidian pe baza concentrației T_4, T_3 și TSH, în funcție de concentrația TBG în ser. De exemplu, se fac încercări să se subclasifice bolile tiroidei, luînd în considerare și raportul T_4/TBG sau T_3/TBG (1).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.11.3.

Concentraţia TBG în ser la normali, în sarcină, în patologia tiroidiană şi hepatică

Starea clinică	Nr.	TBG µg/ml	Referinţa
Copii	—	13,4	
Adulţi tineri	—	9,7	(9)
Bătrîni		12,8	
Normali			
cutiroidieni	98	14,8±4,6	
femei	—	16,6±5,6	(11)
bărbaţi	—	13,7±3,7	
Normali adulţi	51	20,0—48,0	(3)
		34±1,0	
Gravide şi femei tratate cu anticoncepţionale	17	67	(3)
Tireotoxicoză frustă	—	12	(9)
Hipertiroidie gravă	—	10	
Hipertiroidie	8	24	(3)
Hipotiroidie	—	12,6	(9)
Hipotiroidie adulţi	—	sub 35	(3)
Carcinom hepatocelular	19	21±12,9	(10)
Ciroză cu hipoproteinemie	8	26±2,0	(3)

De aceea, au fost întreprinse studii detaliate pentru stabilirea valorilor normale şi s-a observat că există variaţii ale concentraţiei TBG în raport cu vîrsta (1) (fig. II.11.1).

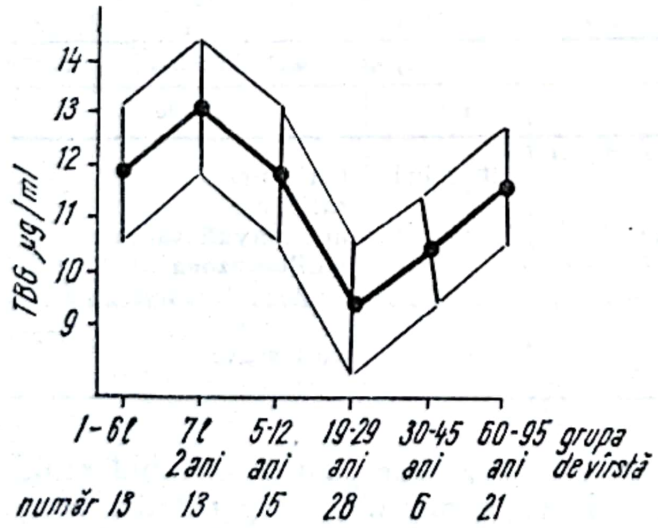


Fig. II.11.1. Valorile TBG (media ± DS) în raport cu vîrsta între o lună şi 95 de ani (referinţa 1).

Menţionăm că tranzinele hormonilor steroizi (sexuali şi glucocorticoizii CSR) sînt cantificate prin metode radioizotopice neimunochimice.

11.2. IMUNOGLOBULINA E (IgE)

11.2.1. INTRODUCERE

Imunoglobulina E (IgE) este a cincea imunoglobulină identificată şi izolată, obişnuit asociată cu anticorpii reaginici prezenţi în serul persoanelor cu diferite stări alergice (13, 14, 15). Predispoziţia la hipersensibilitate faţă de alergene exogene este ereditară şi este determinată genetic de două alele aparţinînd unui singur locus (16).

IgE este o globulină cu GM = 200 000, care migrează electroforetic cu fracţiunile beta lente. Concentraţia sa în serul uman este mult mai redusă

Scanned with OKEN Scanner

(50—100 ng/ml) față de concentrația IgD, IgA, IgM și IgG (cu respectiv 2, 3, 4 și 5 ordine de mărime mai mari). În anumite stări alergice, concentrația IgE crește în ser cu peste două ordine de mărime, de aceea sînt necesare metode sensibile și precise pentru măsurarea IgE în lichidele biologice.

Există două căi principale pentru măsurarea IgE: măsurarea concentrației anticorpilor specifici pentru un anumit alergen și măsurarea concentrației IgE totală.

11.2.2. RIA ANTICORPILOR IgE

Tehnica este cunoscută și sub numele de tehnica cu radioalergosorbent, prescurtat RAST. Problema principală pe care o pune această tehnică este impuritatea preparatelor de alergene, care în majoritate sînt amestecuri brute de diferite derivate proteice, cu mari variații de la un lot la altul.

Principiul tehnicii se bazează pe reacția dintre anticorpii IgE din serul de cercetat și alergenul cuplat covalent pe particule de Sephadex (17) sau celuloză (18). Cantificarea este realizată cu anticorpi anti-IgE marcați cu ^{125}I, și anume cu cît este mai mare concentrația anticorpilor IgE în serul de cercetat, cu atît mai multă radioactivitate va rămîne (după spălare) atașată de complexul alergen-anticorp IgE.

O altă problemă importantă este obținerea serului anti-IgE monospecific pentru IgE (pentru fragmentul Fc). Acest antiser este obținut prin inoculare la animal (iepure, capră) a IgE și serul imun obținut este purificat. Marcarea se face prin metoda cu Cloramina-T la AS de 50—75 $\mu Ci/\mu g$ (19).

Alegerea imunosorbentului introdus în reacție se face pe baza suspiciunilor clinice sau pe baza alergenelor specifice unei anumite zone geografice.

11.2.3. RIA IgE TOTALĂ

Prima tehnică RIA pentru IgE totală este o tehnică cu dublu anticorp în fază lichidă (19, 20).

Antigenul este izolat din serul bolnavilor cu mielom multiplu secretor de IgE monoclonal. Astfel de bolnavi sînt rari, dar cu metodele actuale pot fi mai ușor detectați. Serul este supus extracției și purificării prin fracționare cromatografică și concentrare prin ultrafiltrare (19, 20). Sînt necesare studii privind stabilitatea prin conservare a IgE. IgE din ser este stabil aproximativ 3 luni conservat la —20°C (19).

Antiserul este preparat prin inoculare la iepure sau la capră, după metodele uzuale.

Radioligandul. IgE este marcat cu ^{125}I prin metoda cu Cloramina-T și este stabil aproximativ 2 săptămîni. În reacție se introduce ^{125}I-IgE la o concentrație de 0,1 ng/100 µl.

Standardul IgE este preparat dintr-un ser uman care conține o cantitate cunoscută de IgE. Acest ser standard trebuie calibrat față de British Research Standard pentru IgE furnizat gratuit cu sprijinul OMS (21). Exprimarea rezultatelor se face în unități (U) per mililitru (ml) sau în ng/ml: o unitate este echivalentă cu aproximativ 2 ng.

Valorile IgE variază în limite largi, și la normali, și în stare patologică, de aceea pentru aprecierea unei valori medii observată în cadrul unui grup se recurge la media geometrică (22).

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica de separare se face cu ser anti-gamaglobulina speciei la care a fost preparat primul anticorp.

În varianta în fază solidă, anticorpul anti-IgE este încărcat pe godeuri sau eprubete din plastic şi se adaugă succesiv ser de cercetat sau standard şi ^{125}I-IgE (19, 23).

11.2.4. APLICAŢII CLINICE ŞI REZULTATE

În tabelul II.11.5. sînt prezentate rezultatele obţinute de diferiţi autori la normali (24, 25) şi în stări patologice (25). Valorile concentraţiilor serice la adultul normal variază între 10 şi 530 U/ml (25). Intervalul 450—550 U este considerat de tranziţie între normal şi patologic din cauza suprapunerii între valorile observate la normali şi la bolnavii cu stări de hipersensibilitate (25).

Tabelul II.11.5.

Concentraţia IgE în ser la normali şi în diferite stări patologice (valori orientative)

Grupa	Nr.	IgE (U/ml)
Normali:		
0—6 luni	—	60
6 luni —3 ani	—	100
3—8 ani	—	350
adulţi	225	189±164 (10—530)
Tranziţie normal-patologic		450—530
Urticarie	58	10—2 000
Psoriazis	56	60—2 500
Alergie la penicilină	12	20—5 000
Eczemă atopică	172	50—20 000
Astm alergic	18	400—1 500
Febră de fîn	44	200—1 000
Eczemă	25	60—700

Valorile IgE observate la lucrătorii cu expunere profesională la diferite noxe chimice sînt prezentate în figura II.11.2 (26).

Determinarea IgE totală este utilă în următoarele situaţii clinice (22):

— Diferenţierea astmului şi rinitei atopice[1] şi neatopice.
— Diferenţierea eczemei atopice de cea neatopică.
— Prognosticul alergiei la copii cu predispoziţie ereditară.
— Prognosticul alergiei la copii cu bronşiolită.
— Detectarea şi supravegherea infestării cu paraziţi.
— Detectarea şi supravegherea aspergilozei.
— Detectarea sindroamelor cu hipersensibilitate imediată.
— Caracterizarea stărilor de imunodeficienţă, în special a celulelor-T.
— Completează sau înlocuieşte numărarea eozinofilelor în diagnosticul alergiei.

[1] Atopie = un tip de hipersensibilitate influenţată ereditar, în care substanţa sensibilizatoare reacţionează cu un factor special fixat pe celule numit „reagină" şi care duce la manifestări clinice ca astmul sau febra de fîn.

Scanned with OKEN Scanner

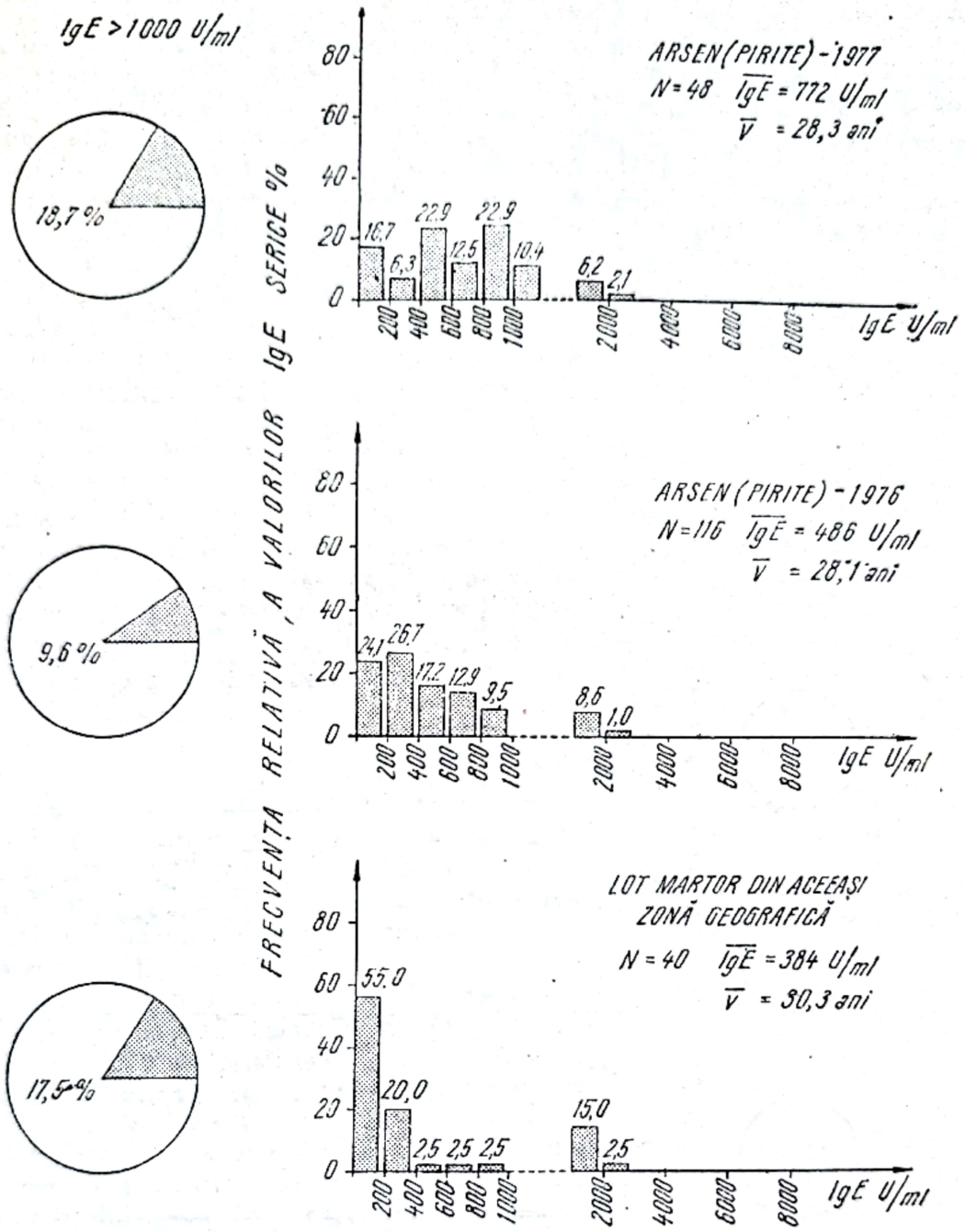


Fig. II.11.2. a — Concentrația IgE serice la persoane cu expunere profesională la compuși cu arsen (pirite) și la martori de vîrste comparabile locuind în aceeași zonă geografică. Observații realizate de Laboratorul RIA al Centrului de Protecție și Igienă a Muncii al M.I.Ch. (referința 26).

11.3. FACTORII REUMATOIZI

11.3.1. INTRODUCERE

Primul test de diagnostic al poliartritei reumatoide (PAR) se bazează pe descoperirea că în serul bolnavilor există un factor care aglutinează hematiile de oaie sensibilizate cu gamaglobulină de iepure (27). Ulterior, au fost

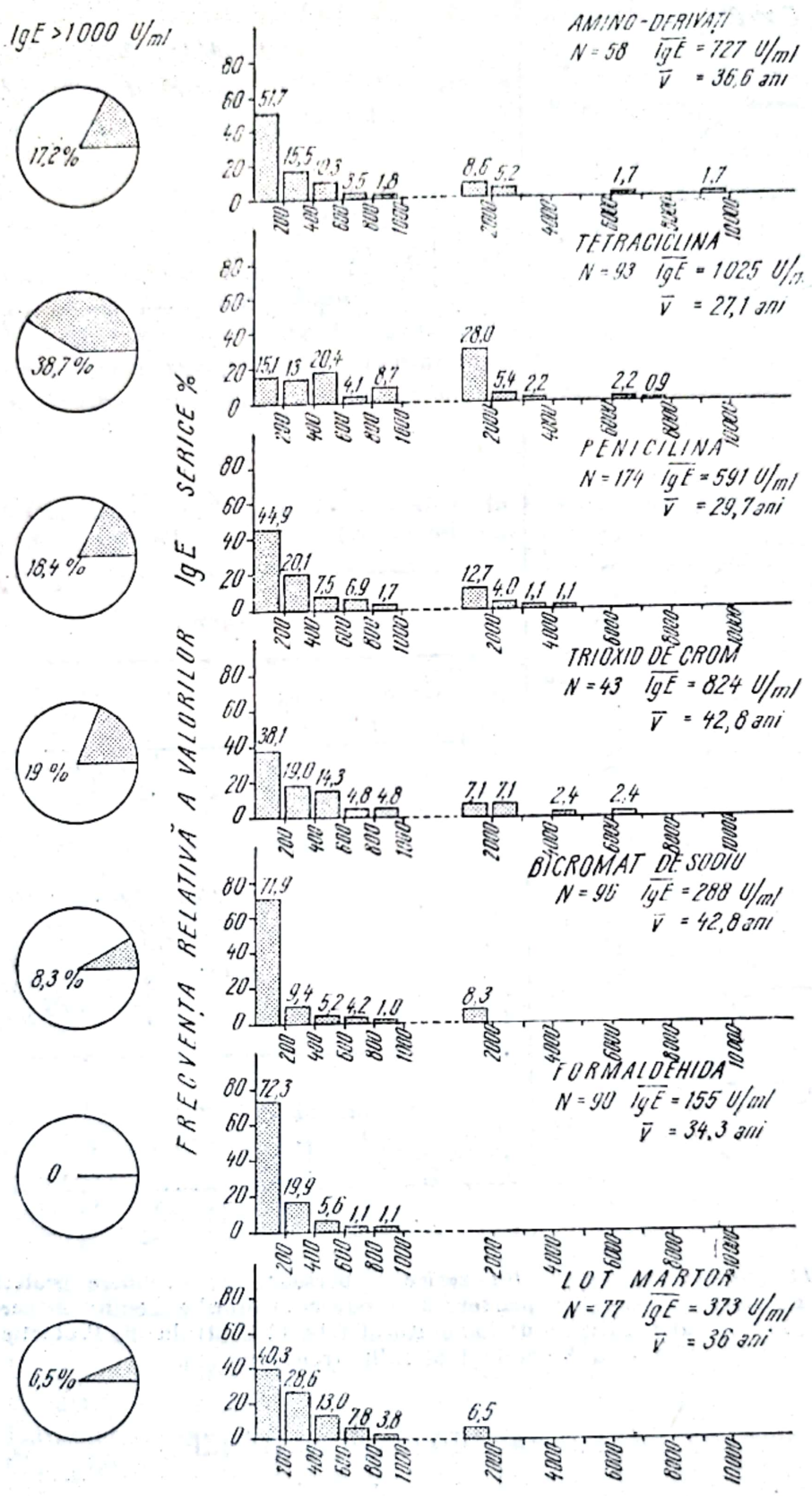


Fig. II.11.2, b — Concentrația IgE serice la persoane cu expunere profesională la aminoderivați și la martori de vîrste comparabile. Observații realizate de Laboratorul RIA al Centrului de Protecție și Igienă a Muncii al M.I.Ch. (referința 26).

descrise variante ale acestui test, cel mai cunoscut fiind aglutinarea particulelor de latex încărcate cu IgG umană (28).

Studiile asupra naturii și proprietății componentei serice, denumită factorul reumatoid (FR), implicată în acest fenomen au arătat că FR este o gamaglobulină din clasa IgM. FR este de fapt un anticorp nu numai anti-gamablobulină de iepure ci și anti-gamaglobulină umană.

FR nu poate fi demonstrat totuși la un număr important de persoane cu PAR, folosind testele uzuale, de aceea s-a cercetat dacă nu este vorba de substanțe încă mai complexe, fără proprietăți aglutinante, dacă nu aparțin și altor clase de Ig (de exemplu IgG și IgA) sau dacă nu sînt mascate în complexe Ag-Ac.

În prezent este acceptată existența unei familii de *factori reumatoizi.* Aceștia sînt în realitate o populație *heterogenă* de imunoglobuline care au o proprietate comună: activitatea anticorp cu specificitate pentru imunoglobuline cu greutate moleculară mică de origine umană sau animală (în special iepure).

Acești FR sînt însă detectabili nu numai în PAR cu teste de aglutinare pozitive sau negative ci și la bolnavi cu alte categorii de artrite; rezultă că acești factori anti-IgG nu sînt specifici pentru PAR. De exemplu, FR au fost detectați în serul bolnavilor cu: poliartrită juvenilă, spondilită anchilozantă, oligoartrită, artrită psoriazică, gută ș.a.

În marea majoritate, factorii reumatoizi au specificitate pentru fragmentul Fc din gamaglobulina umană și de iepure.

11.3.2. TEHNICI DE DOZARE

Tehnicilor serologice de detectare a FR prin reacția de aglutinare a hematiilor sensibilizate (26) sau a particulelor de latex încărcate cu IgG umană (28) le-au urmat tehnicile RIA.

Prima metodă RIA pentru factorii reumatoizi (29, 30) este o tehnică în fază lichidă cu dublu anticorp, capabilă să detecteze numai FR din varietatea IgM (31).

De aceea a fost dezvoltată o nouă tehnică RIA capabilă să pună în evidență un spectru mai larg al FR (31).

11.3.3. RIA ÎN FAZĂ SOLIDĂ PENTRU DETECTAREA FR

Principiul tehnicii se bazează pe competiția RF marcat (^{125}I-FR) și a RF nemarcat pentru *situs*-urile antigenice ale IgG. Separarea se realizează prin insolubilizarea IgG, care are funcție de antigen, prin cuplarea sa pe un suport solid (fig. II.1.3). Cantificarea rezultă din competiția dintre ^{125}I-RF și a RF nemarcat pentru același antigen prezent în IgG de om sau de iepure cuplat pe celuloză activată. Cantitatea de RF nemarcat în mediul de incubare, în condiția în care cantitatea de IgG-celuloză și de ^{125}I-FR sînt menținute constante.

De menționat că această tehnică permite și cantificarea anticorpilor anti-IgG (31).

Antigenul (IgG) insolubilizat. IgG umană (gamaglobulină umană purificată) și IgG de iepure (gamaglobulină de iepure purificată de 10 ori) a fost cuplată pe celuloză activată cu brom-cian (CNBr) în proporție de 1 mg γG la 100 mg celuloză activată. După spălare și resuspendare în tampon se conservă la —20°C (31).

Scanned with OKEN Scanner

FR standard se prepară din serul bolnavilor cu PAR sero-pozitivă, folosind o tehnică imunochimică de fracţionare prin precipitare şi apoi separare a Ac din complexele Ag-Ac precipitate (31, 32). Verificarea se face calitativ prin imunoelectroforeză cu ser antiproteine serice umane şi canti-

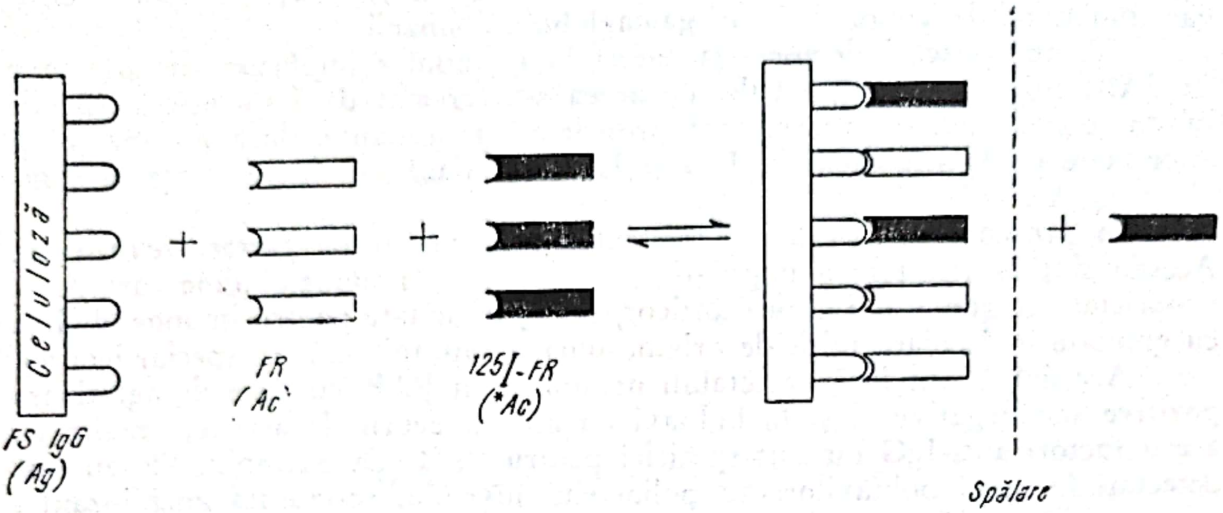


Fig. II.11.3. Principiul radioimunoanalizei pentru factorii reumatoizi, tehnica în fază solidă cu imunosorbent (referinţa 31).

tativ, prin imunodifuzie radială. Conservat în tampon fosfat la —20°C, rămîne stabil timp de 6 luni. Pentru asigurarea stabilităţii este necesară o concentraţie în timpul conservării de cel puţin 10—15 mg% de IgM.

Liofilizarea poate reduce imunoreactivitatea FR, iar concentrarea prin evaporare sub curent de aer poate degrada preparatul. Este preferabilă concentrarea pe polietilenglicol sau prin ultrafiltrare.

Preparatul conţine IgM contaminat cu cantităţi variabile de IgG şi urme de IgA. În această formă este folosit ca preparat de referinţă şi pentru prepararea radioligandului.

FR marcat. Se foloseşte marcarea cu ^{125}I prin metoda clasică cu Cloramina-T. Purificarea RF marcat se face pe coloană de Sephadex G-50 mediu, urmată de repurificare pe G-200 sau pe Sepharoză 4 B (31). La numai o săptămînă după marcare, produsul marcat îşi schimbă aspectul cromatografic prin apariţia a trei picuri în loc de unul, prin apariţia agregatelor macromoleculare şi a fragmentelor (31).

Probele biologice. Determinarea FR se face în ser sanguin şi în lichidul sinovial.

Serul este separat prin centrifugare din sîngele recoltat prin venepuncţie şi conservat la —20°C.

Lichidul sinovial recoltat prin aspiraţie articulară este centrifugat pentru a elimina celulele şi tratat cu heparină pentru a evita formarea cheagului. Este îngheţat la —20°C pînă la folosire.

Întrucît concentraţia FR în ser şi lichidul sinovial este apreciabilă, se introduc în reacţie diluţii progresive, de exemplu: 1:100, 1:200, 1:400 şi 1:800. Astfel, concentraţia găsită se poate înscrie în zona liniară a curbei standard şi se poate testa şi paralelismul cu preparatul standard (31).

Tehnica de separare. Antigenul (IgG) fiind insolubilizat pe celuloză activată, separarea complexelor Ag-Ac de Ac marcat liber se face prin centri-

fugare urmată de o spălare a imunosorbentului, decantare și citirea radioactivității legate pe faza solidă (celuloză).

Performanțe. Tehnica RIA poate fi executată în 24 de ore. Sînt utilizate două tipuri de sisteme RIA: *omolog*, în care antigenul folosit pentru insolubilizare este IgG umană și *heterolog*, cu IgG de iepure, dar cu un spor de sensibilitate pentru sistemul omolog. Legarea trasorului în punctul zero al curbei standard este de 12—25%. Curba se trasează corect în intervalul de concentrație al RF standard de 5 pînă la 2 500 ng/ml pentru sistemul omolog și de 50 la 2 500 ng/ml pentru sistemul heterolog.

Specificitatea este testată cu ajutorul paralelismului curbei obținută cu diluții progresive din serul sau lichidul sinovial al bolnavului cu curba obținută cu FR standard. Paralelismul lipsește la 10—15% din cazuri, datorită probabil producției FR cu afinități diferite pentru IgG. Cînd curbele nu sînt paralele, cantificarea FR în ser sau în lichidul sinovial nu este posibilă. Concentrația obținută în acest caz este apreciată față de alte determinări efectuate la același bolnav la intervale diferite.

Sensibilitatea definită ca cea mai mică doză diferențiabilă statistic de punctul zero al curbei standard, este de 5 ng/ml, dacă se ia intervalul de confidență de 95% pentru doză zero.

Precizia. Coeficientul de variabilitate intraserie este de 5% și interserie de 13% (31).

Truse comerciale: pînă în anul 1977 nu au fost semnalate truse RIA pentru FR. Unii reactivi ca IgG umană sau de iepure foarte purificată se pot obține de la mulți producători de reactivi imunochimici și biochimici.

11.3.4. APLICAȚII CLINICE ȘI REZULTATE

Factorii reumatoizi (anticorpi anti-IgG) sînt prezenți în ser la majoritatea persoanelor normale. Concentrația FR la normali este de ordinul a 8—15 μg/ml, crește multiplicativ în serul bolnavilor cu PAR seronegativi (aglutinarea particulelor de latex, negativă) și crește cu 1—2 ordine de mărime la bolnavii cu PAR seropozitivi (tabelul II.11.6). Concentrația în lichidul sinovial este similară celei din ser, cu diferența că valorile sînt uneori ceva mai mici decît în ser.

Tabelul II.11.6.

Concentrația FR în ser și în lichid sinovial în sistem omolog, la normali și la bolnavi cu PAR seropozitivi și seronegativi (30)

Grupul	FR (μg/ml)	
	ser ($\bar{X} \pm DS$)[1]	lichid sinovial (limite)
Normali	12,6 ± 4,97	13,5—1 200
PAR seropozitivi	672 ± 896	
PAR seronegativi	41,6 ± 25,98	

[1] Media ± deviația standard.

Un aspect neclar este prezența FR în sîngele persoanelor normale. Se crede că ea ar fi datorită anticorpilor antialotipici de origine incertă, probabil ca efect al transfuziilor sau al injecțiilor cu gamaglobuline (33). Acești anti-

Scanned with OKEN Scanner

corpi au specificitate limitată și afinitate redusă spre deosebire de FR care au un spectru larg al specificității și afinitate mare (K de ordinul 10^9) (31, 33).

Tehnicile de aglutinare cu hematii de oaie sau cu particule de latex rămîn în continuare utile clinicii reumatologice. Spre deosebire însă de aceste tehnici care detectează numai anticorpii aglutinanți adică în primul rînd IgM, tehnica RIA permite cantificarea factorilor reumatoizi din diferite clase de imunoglobuline. Tehnica RIA în fază solidă (31) nu se bazează nici pe aglutinare, nici pe natura RF, ci numai pe apartenența lor la categoria largă de imunoglobuline serice. Așadar, prin tehnica RIA pot fi detectați toți factorii reumatoizi, indiferent de natura și de proprietățile lor, cu excepția cel mult a celor mascați în complexe Ag-Ac.

11.4. SOMATOMEDINELE

11.4.1. INTRODUCERE

Studiul somatomedinelor (Sm) a pornit de la observația că hormonul de creștere stimulează creșterea cartilajului numai *in vivo* nu și *in vitro*. Acțiunea lui este deci indirectă și este mediată de alte substanțe. Acestea au fost incluse inițial sub denumirea de factor (sau factori) de sulfatare, datorită capacității lor de a stimula încorporarea sulfatului radioactiv în cartilajul de embrion de găină (34). Sm mai sînt cunoscute și sub numele de NSILA (Non Suppressible Insulin Like Activity) datorită capacității lor de a mima acțiunile biologice ale insulinei care nu pot fi neutralizate de anticorpii antiinsulină.

Astăzi se acceptă că Sm alcătuiesc o familie de peptide plasmatice cu GM între 5 000 și 9 000, implicate în procesul creșterii, care au comun dependența de hormonul de creștere, activități biologice pleiotrope, competitționează cu insulina pentru *situs*-urile de legare la receptor și sînt transportate în circulație de proteine cu GM de aproximativ 50 000 (35, 36, 54).

Familia Sm destul de numeroasă este alcătuită din opt peptide, a căror structură chimică a fost în parte precizată (36) (tabelul II.11.7). Locul de sinteză și de eliberare nu este bine cunoscut, deoarece nici o glandă sau organ nu conține o cantitate mare de Sm. Totuși, ficatul eliberează Sm, eliberarea scăzînd după hepatectomie și revine cînd ficatul se regenerează (37).

11.4.2. TEHNICI DE DOZARE

Pînă la dezvoltarea tehnicilor RIA, care sînt folosite acum și în scop preparativ (46), aproape fiecare membru al familiei Sm a fost detectat cu altă tehnică (34, 35, 36, 38—45), folosită în continuare paralel cu tehnica RIA (48, 49, 50) sau RRA (49, 51, 52).

11.4.3. RIA Sm-B ȘI RIA Sm-C

Imunogenul. Un preparat de Sm-B uman, parțial purificat, conjugat cu o proteină a servit pentru inocularea cobaiului.

Antiserul a fost folosit cu diluția finală 1:1 200.

Radioligandul. Sm-B omogenă a fost marcată cu ^{125}I.

Sensibilitate. 1 ng Sm-B/ml.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.11.7.

Peptide din familia somatomedinelor prezente în circulaţia sanguină la om

Denumirea	Punct izoelectric	GM (aprox.)	Activitatea biologică	Referinţa
Somatomedina A 1	peptid neutru	7 000	captarea sulfatului în cartilajul de embrion de găină	(38) (39)
Somatomedina A 2				
Somatomedina B	peptid acid	4 700	încorporarea timidinei în cultura de celule gliale	(40)
Somatomedina C	peptid bazic	—	stimulează cartilajul de şobolan hipofizectomizat	(35)
NSILA S 1	peptid extractibil în acid	—	mimează activităţile	(41)
NSILA S 2				
NSILA P	peptid neextractibil în acid		insulinei	(42)
MSA[1]	—	—	stimulează mitogeneza în fibroblaste de embrion de găină sau de om	(43) (44) (45)

[1] Multiplication Stimulating Activity — a fost pusă în evidenţă la bovine.

Specificitate intrafamilia Sm: Sm-A, Sm-C şi NSILA-S nu interferează sistemul RIA.

Sistemele heterologe. Sistemul uman poate fi folosit pentru RIA Sm-B numai la primate.

11.4.4. REZULTATE ŞI APLICAŢII ALE RIA-Sm-B

La adulţi tineri, de 20—25 de ani, media concentraţiei Sm-B totală la bărbaţi este de $16,4 \pm 0,9$ μg/ml (nr=30) şi la femei de $19,6 \pm 0,9$ μg/ml (nr=40). Valorile sînt mai mici la copii şi la bătrîni.

Au fost observate numai variaţii lunare nu şi diurne.

Concentraţia Sm-B este mai mare la acromegali decît la normali, dar nu există diferenţe între concentraţia serică la copiii sănătoşi şi la cei cu deficit de creştere.

În cursul sarcinii şi sub terapia cu estrogeni, concentraţia Sm-B creşte ca la acromegali.

Sm-B este prezentă în urină în majoritate sub formă liberă (53). Urina acromegalilor conţine mai multă Sm-B decît cea a copiilor cu nanism hipofizar.

Există o corelaţie pozitivă ($r=0,33$) între concentraţia Sm-B şi Sm-C numai la bărbaţi normali.

RIA pentru Sm-C se efectuează în condiţii similare cu RIA pentru Sm-B (49).

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

partea a II-a

1. **Hesch R. D.** — În: Internat. Symp. on Radioimmunoassay and Related procedures in Medicine", IAEA, 31 oct. — 4 nov. 1977.
2. **Marshall J. S., Levy R. P., Steinberg A. G.** — New Engl. J. Med., 1966, *274*, 1 469.
3. **Inada M., Sterling K.** — J. clin. Invest., 1967, *46*, 1 442.
4. **Levy R. P., Marshall J. S., Velayo N. L.** — J. clin. Endocr., 1971, *32*, 372.
5. **Giorgio N. A., Tabachnick M.** — J. biol. Chem., 1968, *243*, 2 247.
6. **Marshall J. S., Pensky J. J.** — J. clin. Invest., 1969, *48*, 508.
7. **Pensky J. J., Marshall J. S.** — Arch. Biochem., 1969, *135*, 304.
8. **Refetoff S., Fang V. S., Marshall J. S., Robin N. I.** — J. clin. Invest., 1976, *57*, 485.
9. **Bradwell A. R., Burnett D., Ramsden D. B.** — Clin. chim. Acta., 1976, *71*, 501.
10. **Arima T., Takata S., Imai M.** — Acta Med. Okayama, 1976, *30*, 49.
11. **Hesch R. D., Gatz J., McIntosh C. H. S.** — Clin. chim. Acta., 1976, *70*, 33.
12. **Gershengorn M. C., Larsen P. R., Robbins J.** — J. Clin. Endocr., 1976, *42*, 907.
13. **Ishizaka K., Ishizaka T.** — Immunology, 1967, *99*, 1 187.
14. **Johansson S. G. O., Bennich H., Wide L.** — Immunology, 1968, *14*, 265.
15. **Bennich H., Ishizaka K., Johansson S. G. O., Rowe D. S., Stanworth D. K., Terry W. D.** — Bull. Wlth. Organ., 1968, *38*, 151.
16. **Opree W., Krause H., Stockberg H.** — Acta allerg. (Kbh), 1972, *27*, 247.
17. **Wide L., Porath L.** — Biochim. biophys. Acta (Amst.), 1966, *130*, 257.
18. **Johanson S. G. O., Juhlin I.** — Brit. J. Derm., 1970, *82*, 10.
19. **Ransom J. P.** — În: „Practical competitive binding assay methods", Mosby Company, The C. V., Saint Louis, 1976, p. 106.
20. **Gleich G. J., Averbeck A. K., Svedlung H. A.** — J. Lab. clin. Med., 1971, *77*, 690.
21. **Rowe D. S.** — Bull. Wrld. Hlth. Organ., 1970, *43*, 609.
22. — „The Clinical value of total and specific IgE determinations" 10 years of IgE 1967—1977, Pharmacia Diagnostics, Uppsala Grafiska, Suedia, 1977.
23. **Smith H. J.** — J. Allergy, 1972, *50*, 193.
24. **Dessaint J. P.** — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine" IAEA, Viena, 1974, vol. 2, p. 338.
25. **Depp M., Grebe S., Müller H., Graul E. H., Brehm K.** — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine" IAEA Viena, 1974, v. 2, p. 331.
26. **Ivănescu Maria, Berinde Mihaela, Pelin M.** — Al VII-lea Simpozion CAER-INTAB, Varşovia, 1979, volumul de rezumate.
27. **Waaler E.** — Acta path. microbiol. scand., 1940, *17*, 172.
28. **Singer J. M., Plotz C.** — Amer. J. Med., 1966, *21*, 888.
29. **Franchimont P., Şuţeanu Şt.** — Arthr. and Rheum., 1969, *12*, 483.
30. **Şuţeanu Şt., Franchimont P.** — Med. interna (Buc.), 1969, *21*, 181.
31. **Focan-Henrard D., Franchimont P.** — În: „Handbook of Radioiummnoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 1977, p. 571.
32. **Lospalluto J., Ziff M.** — J. exp. Med., 1959, *110*, 169.
33. **Ropartz C.** — Bull. Inst. Pasteur, 1971, *69*, 107.
34. **Salmon W. D. Jr., Daughaday W. H.** — J. Lab. clin. Med., 1957, *61*, 120.
35. **Van Wyk J. J., Underwood L. E., Hintz R. L., Clemmons D. R., Voina S. J., Weaver R. P.** — Recent Progr. Hormone Res., 1974, *30*, 259.
36. **Daughaday W. H.** — În: „Clinics in Endocrinology and Metabolism" (editat de G. M. Besser), Saunders W. B., Co Ltd. Londra — Philadelphia — Toronto, 1977, vol. 6, nr. 1, p. 117—135.
37. **Uthne K., Uthne T.** — Acta Endocr., 1972, *71*, 255.
38. **Hall K., Takano K., Fryklund L., Sievertsson H.** — Advanc. Metab. Disorders, 1975, *8*, 19.
39. **Sievertsson H., Fryklund L., Uthne K., Westermark B.** — Advanc. Metab. Disorders, 1975, *8*, 47.
40. **Hall K., Olin P.** — Acta Endocr., 1972, *69*, 417.

Scanned with OKEN Scanner

41. **Froesch E. R., Zapf J., Meuli C., Mader M., Waldvogel M., Kaufmann U., Morell B.** — Advanc. Metab. Disorders, 1975, *8*, 211.
42. **Froesch E. R., Zapf J., Rinderknecht E., Kaufmann U., Meuli C., Schoenle E., Humbel R. E.** — În: „Endocrinology", Proc. Vth. Internat. Congress Endocr., Hamburg, 18—24 iulie 1976 (editat de V. H. T. James), Excerpta Med., Amsterdam-Oxford, 1977, vol. 2, p. 167.
43. **Pierson R. W. Jr., Temin H. M.** — J. cell. comp. Physiol., 1972, *79*, 319.
44. **Smith G. L., Temin H. M.** — J. cell. comp. Physiol., 1974, *84*, 181.
45. **Rechler M. M., Podskalny J. M., Goldfine I. D., Wells C. A.** — J. Clin. Endocr., 1974, *39*, 512.
46. **Megyesi K., Cahn C. R., Roth J., Gorden P.** — În: „Endocrinology", Proc. V. th. Internat. Congress Endocr., Hamburg, 18—24 iulie, 1976 (editat de V. H. T. James), Excerpta med., Amsterdam-Oxford, 1977, vol. 2, p. 173.
47. **Phillips L. S., Daughaday W. H.** — În: „Endocrinology", Proc. V th Internat. Congress Endocr., Hamburg, 18—24 iulie 1976 (editat de V. H. T. James), Excerpta Med., Amsterdam-Oxford, 1977, vol. 2, p. 150.
48. **Yalow R. S., Hall K., Luft R.** — J. clin. Invest., 1975, *55*, 127.
49. **Furlanetto R. W., Dercole A. J., Underwood L. E., van Wyk J. J.** — În: „V th Internat Congress Endocr.", Hamburg 18—24 iulie 1976, Abstr. Short. Commun., nr. 392.
50. **Hall K., Iuft R., Takano K.** — În: „Endocrinology", Proc. V th Internat Congress Endocr., Hamburg, 18—24 iulie, 1976 (editat de V. H. T. James), Excerpta Med., Amsterdam—Oxford, 1977, vol. 2, p. 162.
51. **Hall K., Takano K., Fryklund L., Sievertsson H.** — Advanc. Metab. Disorders, 1975, *8*, 61.
52. **Marshall R. N., Underwood L. E., Voina S. J., Foushee D. B., Van Wyk J. J.** — J. Clin. Endocr., 1974, *39*, 283.
53. **Yalow R. S., Hall K., Luft R.** — J. Clin. Endocr.. 1975, *41*, 638.
54. **Hintz R.L., Liu F., Rinderknecht E.** — J. Clin. Endocrinol., Metab. 1980, *51*, 672.

Scanned with OKEN Scanner

12

ANTIGENELE VIRALE ȘI BACTERIENE ȘI ANTICORPII LOR

12.1. ANTIGENELE VIRALE ȘI ANTICORPII LOR

12.1.1. ANTIGENUL HEPATITEI B

Antigenul Australia sau antigenul hepatitei B (AgHB) este prezent în sîngele bolnavilor cu crize de hepatită B (serică) și la purtătorii de virus. De aceea, descoperirea acestui antigen (1) a stimulat dezvoltarea tehnicilor de virologie aplicabile în studii clinice și epidemiologice. Față de hepatita A infecțioasă clasică, hepatita B are o perioadă de incubare mai lungă. Particulele virale constau dintr-un nucleu sau „coră", antigenul HBc înconjurat de un înveliș — Antigenul HBs. Este discutabil dacă antigenul este infectant prin el însuși sau este numai un marcher specific pentru hepatita B. Antigenul este asociat cu particula așa-numită „Dane" considerată de mulți cercetători ca adevărata unitate infectantă a antigenului hepatitei B.

Metodele de laborator pentru detectarea antigenului hepatitei B se adresează numai antigenului de suprafață Ag HBs.

Ag HBs este heterogen: determinantul „a" este comun tuturor tipurilor; determinantele „d" și „y" se exclud reciproc, ca și determinantele „r" și „w". Sînt posibile astfel patru tipuri: „adw", „ayw", „adr" și „ayr" (2, 3), a căror semnificație epidemiologică nu a fost pe deplin clarificată (4).

Antigenul HBs este o particulă sferică, cu greutate moleculară mare și proprietăți biofizice determinate (5).

12.1.2. TEHNICI DE DETECTARE

Virusul hepatitei B nu poate fi cultivat *in vitro* în condiții uzuale, de aceea metodele de detectare în masă nu se pot baza pe demonstrarea capacității de infectare pe această cale. Chiar dacă s-ar putea crește în culturi de țesut, metoda ar fi prea fastidioasă pentru a fi aplicabilă în scop de *screening* (4).

Scanned with OKEN Scanner

De aceea, o dată cu descoperirea antigenului, au fost dezvoltate tehnici de detectare a antigenului hepatitei B şi a anticorpilor săi pe principiul metodelor serologice clasice, tehnici fizico-chimice, enzimatice şi radioimunochimice (tabelul II.12.1).

Tabelul II.12.1.

Metode de detectare a AgHBs şi a anticorpilor

Metoda	Rezultatul	Referinţa
Serologice		
Imunodifuzia (ID)	Da—Nu	
Fixarea suplimentului (FC)	Titrare	(6, 7)
Hemaglutinarea pasivă	Da — Nu	(8)
Inhibiţia hemaglutinării	Titrare	
Particule Latex (LA)	Da — Nu	(9)
Neutralizarea virusului	Da — Nu	
Fizico-chimice		
Contraelectroforeza (CEF)	Titrare	(10)
Enzimatice		
ELISA[1]	Da — Nu sau titrare	
Radioizotopice		
RIA cu trasor Ag HBs	Da — Nu	(11, 12, 13, 14, 15, 22)
HBsAg subtipuri	Titrare	(4, 15)
RIA Ac-HBsAg cu trasor Ac cobai	Da — Nu	
IRMA[2]	sau titrare	(13)
HBsAg cu trasor Ac uman		
IRMA Ac-HBsAg		
IRMA subtipuri	Da — Nu sau titrare	(17, 18, 19, 20)

[1] ELISA — Enzyme Linked Immunosorbent Assay.
[2] IRMA — Immuno Radio Metric Assay.

În zonele în care metodele RIA nu sînt accesibile, se recurge la reacţia de hemaglutinare, la contraelectroforeză (CEF) sau la metoda enzimatică. Metodele RIA s-au impus prin superioritatea sensibilităţii, preciziei şi randamentului lor.

12.1.3. TEHNICA RIA

Formule tehnice. În ceea ce priveşte hepatita B, tehnicile RIA se adresează antigenului şi subtipurilor sale, anticorpului şi complexelor antigen-anticorp. Categoriile de tehnici adoptate sînt tehnici RIA clasice în fază lichidă cu separare printr-una din metodele uzuale (11, 12, 13, 16, 17, 22) şi tehnici imunoradiometrice (IRMA) în fază solidă (13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

Antiserul. În primele tehnici RIA a fost folosit ser de cobai anti-Ag HBs. Totuşi, serurile umane care conţin anticorpi anticobai dau reacţii falspozitive în special în tehnicile IRMA cu trasor anticorp. De aceea, s-a recurs la ser uman cu anticorpi anti-Ag HBs ca prim anticorp în RIA cu dublu anticorp (12) sau cu trasor antiser uman în tehnicile IRMA. Pentru subtipuri

Scanned with OKEN Scanner

se folosesc antiseruri adsorbite sau care conţin dominant anticorpi pentru un subtip (4, 22).

Trasorul. În tehnicile RIA clasice, trasorul este Ag HBs (sau subtipurile „ad" şi „ay") marcat cu ^{125}I, iar în tehnicile IRMA este fie anticorpul de cobai, fie cel uman foarte purificat (4) şi marcat cu ^{125}I.

Standardul. Determinarea Ag HBs se face fie calitativ, deci teste „da-nu" cu ajutorul unui ser martor negativ, fie cantitativ cu ajutorul unei curbe standard realizată cu doze progresive de Ag HBs între 2 şi 400 μg/ml (0,02—0,40 μg ml incubat). Detectarea anticorpilor anti-HBs Ag se face prin tehnicile RIA întrebuinţate pentru titrarea antiserurilor.

Tehnica de separare. În metoda RIA clasică în fază lichidă, separarea se face cu ajutorul tehnicilor uzuale: cromatoelectroforeză, dublu anticorp, precipitare cu sulfat de amoniu. Metoda IRMA recurge la faza solidă cu adsorbţie pe eprubete (13, 21), pe microsfere de polistiren ca în trusa comercială Abbott, cu avantajul că este evitată centrifugarea.

Performanţe

Sensibilitatea metodei RIA comparativ cu celelalte metode poate fi apreciată de exemplu prin stabilirea diluţiei maxime pozitive (23). S-a putut astfel observa că RIA rămîne pozitivă la o diluţie de 800—1 000 de ori mai mare decît ID, de 200 de ori mai mare decît CEF, de 100 de ori mai mare decît FC, de 20 de ori mai mare faţă de hemaglutinare şi aproximativ la paritate cu ELISA.

Numărul rezultatelor fals-pozitive este mult mai redus cu RIA şi se poate face controlul cu ajutorul testelor de confirmare.

Specificitatea. Reacţiile fals-pozitive apar în special cu tehnicile care folosesc primul anticorp de cobai. Dacă serurile testate conţin cantitate suficientă de antigen HBs atunci se pot practica teste de adsorbţie. Un alt mod de abordare a specificităţii este controlul cu sisteme RIA pentru subtipuri. Dacă se practică numai testarea prin metoda RIA, nu în paralel cu altă metodă (hemaglutinare, CEF sau ELISA), rezultatele trebuie atent validate.

Exactitatea rezultatelor depinde de stabilirea concentraţiei Ag şi a subtipurilor, dar şi de Ac, întrucît prezenţa anticorpilor HBsAg poate influenţa rezultatul.

Precizia rezultatelor, exprimată prin variabilitatea intra- şi interserii are aceeaşi importanţă ca şi pentru alte tehnici şi este cu deosebire utilă pentru urmărirea evoluţiei hepatitei.

12.1.4. APLICAŢII ŞI REZULTATE

Determinările RIA pentru HBsAg şi subtipuri şi pentru anticorpi sînt utile pentru detectarea donatorilor de sînge purtători, pentru diagnosticul şi urmărirea evoluţiei hepatitei virale B şi pentru studii populaţionale privind detectarea purtătorilor de Ag HBs, de exemplu pentru lucrătorii în domeniul alimentaţiei publice, inclusiv lucrătorii din fabricile de produse alimentare. Distincţia dintre normali (HBsAg negativi) şi contaminaţi (HBsAg pozitivi) este stabilită de producătorul fiecărei noi truse care trebuie să includă seruri-martor negative şi pozitive şi instrucţiunile de însoţire să conţină modalitatea de calcul.

Scanned with OKEN Scanner

12.1.5. ALTE VIRUSURI ŞI ANTICORPI VIRALI

Au fost dezvoltate sisteme RIA şi IRMA şi variante ale lor pentru detectarea şi cantificarea altor virusuri şi anticorpi virali în lichidele biologice printre care menţionăm: proteina virală tip C şi antivirus tip C (24, 25, 26, 27), virusul poliomielitei (28), anticorpi antirabici (29), antigripali (30) (tip A2-Japonia 170/62 şi A2-Hongkong 68). Unele sisteme sînt destinate studiilor zootehnice, ca de exemplu pentru virusul tumorii aviare (31) sau cel oncocornean aviar (32).

12.2. ANTIGENELE BACTERIENE ŞI ANTICORPII LOR

12.2.1. INTRODUCERE

Antigenele bacteriene şi anticorpii lor prezintă, ca şi cele virale, interes clinic şi epidemiologic. O serie de teste de laborator, anterioare RIA au servit şi sînt în continuare utile pentru detectarea şi măsurarea lor, fiind adesea folosite concomitent. Metodele RIA şi IRMA sînt utile în special cînd metodele clasice nu pot fi folosite pentru studii populaţionale. De asemenea, sînt folosite ori de cîte ori concentraţia serică a antigenului sau a anticorpului nu este suficient de mare pentru a fi detectate cu metodele neizotopice (33). În general însă, metodele clasice sînt suficiente, radioizotopii sînt folosiţi mai mult pentru marcarea antigenelor necesare în studii de localizare *in vivo*.

12.2.2. TEHNICI CLASICE ŞI RIA

În tabelul II.12.3. sînt prezentate tehnicile *in vitro* şi *in vivo* clasice şi RIA utilizate pentru detectarea antigenelor bacteriene şi a anticorpilor lor. În cazul antigenelor bacteriene care sînt macromolecule complexe, RIA nu poate fi acceptată ca panaceu universal, de aceea adeseori este folosită concomitent cu alte metode (33).

Tabelul II.12.3.

Antigene bacteriene şi anticorpi detectaţi prin metode imunologice clasice şi prin RIA, IRMA şi variantele lor

Antigenul	Metoda	Referinţa
Toxina tetanică Toxina botulinică Toxina stafilococică	Precipitare RFC Hemaglutinare directă Şoc anafilactic Toxicitate RIA IRMA şi variante	(33)
Anticorpii		
Tetanici Holerici Tifici Dizenterici Difterici Stafilococici Bacili Koch Bacilul leprei Meningococi	Testul de protecţie antitoxine Hemaglutinare Radioimunoprecipitare RIA	(33)

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. **Blumberg B. S., Alter H. J., Visnich S.** — J. Amer. med. Ass., 1965, *191*, 541.
2. **Le Bouvier G. L.** — J. infect. Dis., 1971, *123*, 671.
3. **Bancroft W. H., Mundon F. K., Russell P. K.** — J. Immunol., 1972, *109*, 842.
4. **Cameron C. H., Dane D. S.** — Brit. Med. Bull., 1974, *30*, 90.
5. **Gerin J. L., Purcell R. H., Hoddan M. D., Holland P. V., Chanock R. M.** — J. Virol., 1969, *4*, 763.
6. **Tsoukas S., Papaevangelou G. J.** — Bull. Hell. Microbiol. Soc., 1972, *17*, 116.
7. **Shulman N. R., Braker L. F.** — Science, 1969, *165*, 304.
8. **Vyas G. N., Shulman N. R.** — Science, 1970, *170*, 332.
9. **Graten M. J., Entwistle S. W., Walker J. A., McConell D. S.** — Lancet, 1973, *1*, 485.
10. **Holland P. V., Purcell R. H., Smith H., Alter H. J.** — J. Immunol., 1972, *109*, 420.
11. **Walsh J. H., Yalow R. S., Berson S. A.** — J. Infect. Dis., 1970, *121*, 550.
12. **Coller J. A., Millman I., Halbherr T. C., Blumberg B. S.** — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1971, *138*, 249.
13. **Hollinger F. B., Vorndam V., Dreesman G. R.** — J. Immunol., 1971, *107*, 1 099.
14. **Ling C. M., Overby L. R.** — J. Immunol., 1972, *109*, 834.
15. **Hollinger F. B., Aach R. D., Gitnick G. L., Roche J. K., Melnich J. L.** — New Engl. J. Med., 1973, *289*, 386.
16. **Aach R. D., Grisham J. W., Parker C. W.** — Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 1971, *68*, 1 056.
17. **Amouch P. J., Drouet J., Courouce A. M.** — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. II, p. 399.
18. **Bancroft W. H., Mundon F. K., Russell P. K.** — J. Immunol., 1972, *109*, 842.,
19. **Ginsberg A. L., Bancroft W. H., Conrad M. E.** — J. Lab. clin. Med., 1972, *80*, 291.
20. **Ling C. M., Irace H., Decker R., Overby L. R.** — Science, 1973, *180*, 203.
21. **Miller J. P., Kurjian J. C.** — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 2, p. 359.
22. **Ransom J. P.** — Practical competitive biding assay methods, Mosby Company. The C. V., Saint Louis, 1976, p. 104.
23. **Vranckx R., Cole J., Peetermans M.** — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", 1977, IAEA, Viena, 1978, p. 277.
24. **Parkes W. P., Scolnik E. M.** — Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 1972, *69*, 1 766.
25. **Oroszlaw S., White M., Gilden R. V., Charman H. A.** — Virology, 1972, *50*, 294.
26. **Scolnik E. M., Parks W. P., Livingston D. M.** — J. Immunol., 1972, *109*, 570.
27. **Parkes W. P., Livingston D. M., Todaro G. J., Benveniste R. E., Scolnik E. M.** — J. exp. Med., 1973, *137*, 622.
28. **Cerloff R. K., Hoyer B. H., McLaren L. C.** — J. Immunol., 1962, *89*, 559.
29. **Wictor T. J., Koprowski H., Dixon F.** — J. Immunol., 1972, *109*, 464.
30. **Daugharty H., Davis M. L., Kaye H. S.** — J. Immunol., 1972, *109*, 849.
31. **Weber J., Yohn D. S.** — J. Virol., 1972, *9*, 244.
32. **Fritz R. B., Qualtiere L. F.** — J. Virol., 1973, *11*, 736.
33. **Habermann E. R.** — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 2, p. 341.

Scanned with OKEN Scanner

13

SUBSTANȚE FOLOSITE ÎN TERAPIE

13.1. GLICOZIDE CARDIACE

13.1.1. GENERALITĂȚI

Manifestările toxice ca urmare a administrării digitalei reprezintă un inconvenient major al terapiei cardiace. Incidența intoxicației cu digitală variază între 8 și 23% (1). Pe de altă parte, 36% din bolnavii tratați cu glicozide cardiace sînt subdigitalizați (1, 2). Tehnicile de dozare anterioare metodei RIA, au demonstrat că există o relație între concentrația serică a glicozidelor cardiace și efectul lor farmacologic sau clinic iar alterările ritmului cardiac și manifestările extracardiace (simptome nervoase și gastrointestinale) sînt corelate cu doza de digitală (1, 3).

Toate aceste observații au dus la concluzia că este necesară o metodă rapidă, ieftină și sensibilă pentru cantificarea glicozidelor în clinica umană.

Sub numele de glicozide cardiotonice se includ vreo 50 de compuși de origine vegetală, care, în doză mică, cresc contractilitatea miocardului (debitul cardiac), iar în doză mare opresc contracțiile inimii în sistolă. Aceste substanțe au fost folosite de indigenii din Africa și Malaesia ca otrăvuri pentru săgeți.

Glicozidele cardiotonice dau prin hidroliză acidă sau enzimatică zaharuri și agliconi[1] cu structură steroidică; agliconii sînt numiți *genine*. Caracteristică pentru toate geninele din grupa cardiotonicelor digitalice și strofantinice este prezența inelului lactonic. Acțiunea cardiotonică este determinată în primul rînd de natura agliconilor și anume de catena laterală lactonică a acestora (fig. II.13.1 și II.13.2.), dar ea nu este independentă de natura componentei zaharice; agliconii liberi sînt otrăvuri puternice.

Glicozidele cardiotonice uzuale sînt digitala, strofantina (tabelul II.1.3.1, fig. II.13.1 și II.13.2.) și ouabaina. Ouabagenina se deosebește de strofantinină prin prezența la C^{10} a unei grupări alcool primar CH_3OH în locul grupării aldehidice.

[1] Aglicon = componenta nezaharică a glicozidelor naturale.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.13.1.

Glicozide tonicardiace

Preparatul	Glicozidul	Cantitatea/ doză (în mg)	Doza/zi[1] (în mg)
Digitalis = pulbere din frunze de *Digitalis purpurea*	Toate glucozidele, dominant digitoxina	100	200–300
Digitalina = glucozid cristalizat	Digitoxină	0,1	1
Digozina	Digoxina	0,25–1,5	1,5–3
Lanatozid C	Glucozid C	0,4	0,6–1,2
Strofantina, extract din *Strophantus gratus*	Strofantoxid-G	0,1	0,3

[1] Adulți.

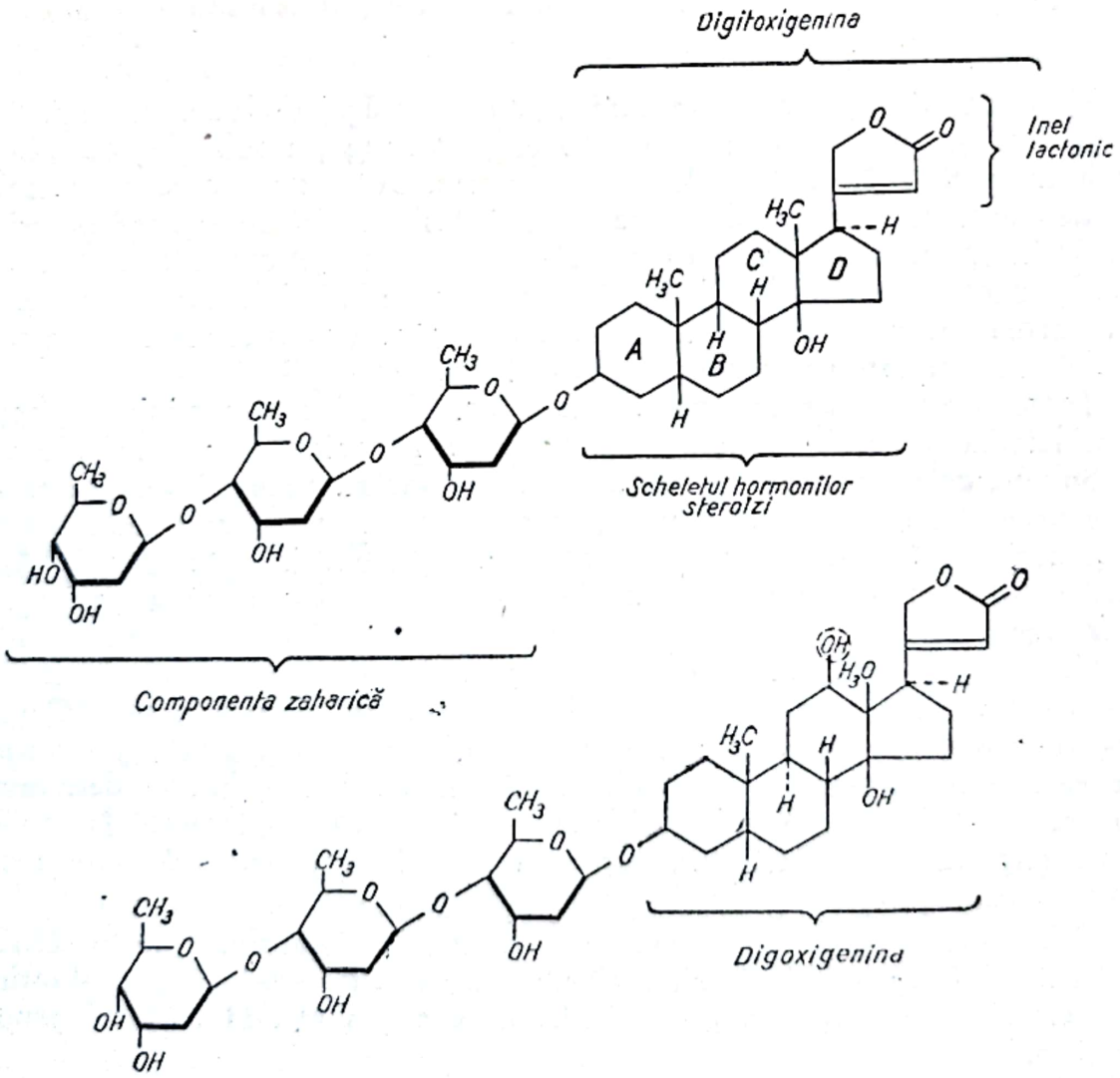


Fig. II.13.1. Formula chimică a glicozidelor cardiotonice digitoxina și digoxina. Structura generală este de steroid-lactonă. Geninele au scheletul de Carbon al acizilor biliari.

Scanned with OKEN Scanner

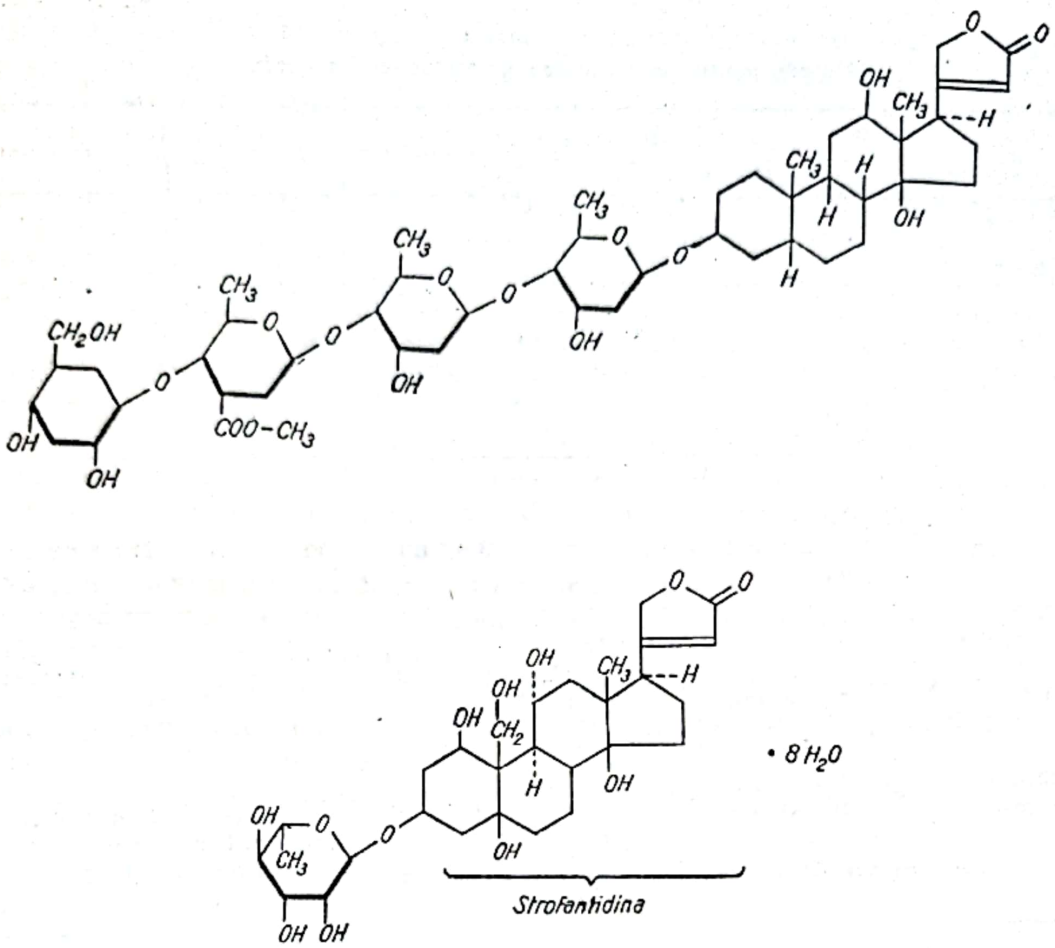


Fig. II.13.2. Formula chimică a glicozidelor cardiotonice: lanatozid C (extract de *Digitalis lanata*) și strofantina (extract de *Strophantus gratus*).

13.1.2. METODE DE CANTIFICARE A GLICOZIDELOR TONICARDIACE

Determinarea cantitativă a glicozidelor cardiace s-a făcut inițial prin metode chimice, elaborate cu scopul stabilirii concentrației de substanță activă în preparatele farmaceutice de digitală. Ulterior, metodologia a evoluat către RIA, trecînd prin metode biologice, radioizotopice și radioenzimatice (tabelul II.13.2).

13.1.3. RADIOIMUNOANALIZA GLICOZIDELOR TONICARDIACE

Tehnica RIA pentru digitoxină și digoxină a fost introdusă în anii 1968—1969 (4, 5); lucrările ulterioare au adus perfecționări, progrese tehnice (1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) și rezultate ale aplicațiilor în clinica umană.

Antiserul se obține prin inocularea la iepuri a conjugatelor glicozid-proteină. Anticorpii recunosc în special determinantele din inelele C și D ale porțiunii steroide a moleculei și mai puțin porțiunea zaharică. Au fost obținuți anticorpi specifici pentru digoxină (16, 17), digitoxină (7), ouabaină (18, 19) și acetilstrofantină (20). Antiserurile bine selecționate pot distinge digoxina de

Tabelul 11.13.2.

Metode pentru cantificarea glicozidelor tonicardiace

Metode	Glicozidul	Lichidul biologic	Sensibilitate	Avantaje	Dezavantaje
Chimice (colorimetrice) picrat alcalin	digitoxina digoxina	neaplicabile lichidelor	mg	exacte	laborioase şi insensibile
dinitrobenzen alcalin xanthidrol	digitoxina şi digoxina	biologice	µg		
Biologice cord de embrion de raţă	lanatozid C digitoxină		5 ng/ml		laborioasă
Radioizotopice dublă diluţie izotopică	digitoxina	extracte din plasmă, sînge, urină, fecale	1 ng/ml		laborioasă, costisitoare; volume mari de produse biologice
gaz lichid cromatografie	digoxina	extracte din ser, plasmă	0,2 ng/ml	foarte specifică, utilă pentru metaboliţi	laborioasă, necesită extracţii
inhibiţia captării 86_{Rb}	digitoxina digoxina	extracte din ser, plasmă	0,2 ng/ml	sensibilă	metaboliţii pot interfera
Radioenzimatice legare competitivă la Na^+, K^+-ATP-ază	digitoxina digoxina	extracte din ser	0,2 ng/ml	sensibile	laborioasă
Radioimunologice RIA	digitoxina digoxina strofantina ouabaina	orice lichid biologic neprelucrat	2 ng/ml 0,2—0,02 ng/ml	sensibile, volum mic: sub 0,1 ml ser	—

digitoxină, deşi moleculele lor nu diferă decît printr-un OH în plus la C_{12} în molecula de digoxină (1, 5, 17).

Steroizii endogeni ai mamiferelor nu dau reacţii încrucişate care să perturbe sistemele RIA. În sisteme de dozare cu anticorpi cu afinitate slabă pot interfera steroizii administraţi terapeutic.

Trasorul. Preparatele de glicozid tritiat tind să fie înlocuite cu cele radioiodurate (13) de tipul ^{125}I — TME — digoxină. Cantitatea de trasor introdusă în sistem este de aproximativ 0,2—0,3 ng, adică, de exemplu, 0,1 ml din concentraţia de 2—3 ng/ml.

Scanned with OKEN Scanner

Standardul. Se folosesc glicozide cristalizate foarte pure. Cînd puritatea este dubioasă, se verifică prin TLC (thin layer chromatography = cromatografie în strat subţire).

Protocol pentru prepararea standardului de digoxină (21).

Soluţia mamă. Digoxină cristalizată se dizolvă la concentraţia de 200 μg/ml (de exemplu 10 mg în 50 ml) în alcool de 95% şi se păstrează la —20°C.

Standardul intermediar. Din soluţia mamă se prepară o diluţie 1 : 100 în tampon, care rămîne stabilă la —20°C, timp de 2 luni.

Standardul de lucru se prepară imediat înainte de folosire, diluînd standardul intermediar în tampon pentru concentraţii finale de 10; 5; 3; 2; 1; 0,5 şi 0,2 ng/ml.

Probele biologice se recoltează la un interval de cel puţin 5—6 ore de la ultima administrare, deoarece rezultatele sînt clinic semnificative numai dacă a trecut suficient timp de la administrarea ultimei doze pentru a se putea stabili un echilibru între compartimentul plasmatic şi cel tisular. Doza şi momentul ultimei doze sînt notate riguros.

Mediul de incubare: tampon fosfat ± NaCl, albuminat, pH uşor alcalin (7,4—7,6) sau Tris—HCl.

Condiţii de incubare. Fără preincubare, durata în funcţie de urgenţe, de la 30 de minute la 24 de ore (nu sub 30 de minute — pot apărea reacţii încrucişate); temperatura camerei sau +4°C.

Tehnica de separare: cărbune dextran suspensie sau tablete.

Performanţe

Sensibilitate: 2 ng/ml pentru digitoxină; 0,2—0,02 ng/ml pentru digoxină.

Specificitate: nu interferează steroizii endogeni; pot interfera steroizi exogeni. Pentru dozarea digitoxinei, ouabainei şi strofantinei poate fi folosit sistemul heterolog trasor digoxină — ser antidigoxină, cu condiţia ca standardul să fie omolog (1, 7, 17).

Precizia: intraserie, CV% — 5—10%;
interserii, CV% = 30%.

Randament: un operator efectuează 50 de probe pe zi, în condiţii de automatizare a fazelor de citire a radioactivităţii şi a calculului.

Surse de eşec: standard şi trasor impure; antiser inadecvat; probe biologice contaminate cu hemoglobină sau pigmenţi biliari (în special pentru sistemele RIA cu trasor tritiat); steroizi exogeni.

13.1.4. APLICAŢII CLINICE ŞI REZULTATE

Relaţia glicozid seric — doză administrată

Dacă se iau în considerare factori ca greutatea şi funcţia renală se poate stabili o corelaţie între concentraţia serică şi doza de glicozid administrată. Totuşi, alterarea funcţiei renale determină concentraţii serice crescute numai pentru digoxină, nu şi pentru digitoxină şi implicit pulberea de foi de digitală (1).

Relaţia glicozid seric — intoxicaţie cu digitală

Concentraţia serică a *digoxinei* la pacienţi neintoxicaţi variază între 1,0 şi 1,6 ng/ml şi creşte de 2—3 ori (multiplicativ) la cei intoxicaţi (1, 4,

Scanned with OKEN Scanner

6, 12, 17, 23, 33). Predispoziția la intoxicația cu digoxină pare să fie mai accentuată la pacienți cu funcția renală alterată (azotul ureic sanguin mare) și la bătrîni. Se consideră că valori de 0,7—2,0 ng/ml în sîngele recoltat la 6 ore după ultima doză corespund digitalizării optime. Valori peste 2,0 ng/ml sînt considerate potențial toxice.

Concentrația *digitoxinei* la pacienții neintoxicați variază între 17 și 25 ng/ml și se dublează la cei cu manifestări toxice. La concentrații serice sub 20 ng/ml este puțin probabil să apară fenomene toxice. Valorile sînt similare la pacienții tratați cu digitoxină și la cei tratați cu foi de digitală (1). Spre deosebire de cei tratați cu digoxină, ureea sau creatinina serică nu sînt crescute la cei care prezintă fenomene de intoxicație.

Un neajuns al diferențierii cantitative între intoxicați și neintoxicați este suprapunerea relativ frecventă a valorilor obținute în cele două situații clinice (1, 7, 24, 32).

Farmacologia glicozidelor tonicardiace

RIA glicozidelor tonicardiace este folosită și în studiul unor aspecte speciale de farmacologie și toxicologie a acestor substanțe. A fost studiată farmacocinetica digitalei la nou-născut, sugar și copil (33, 34), observîndu-se că doza raportată la kilocorp este mai mare ca la adulți și că deși concentrația serică a digoxinei este mai mare ca la adulții intoxicați, totuși nu apar semne de intoxicație digitalică (1).

Alte studii au inclus farmacodinamia digitalicelor la pacienți cu malabsorbție și la cei cu șunt cardio-pulmonar.

Albumina serică leagă în mod variabil glicozidele cardiace (15), dar antiserurile folosite în RIA au aviditate mare pentru haptena specifică, de aceea sistemul de dozare măsoară concentrația *totală* din ser, nu numai fracțiunea „liberă" (nelegată de albumină) (5). Cu toate acestea, captarea glicozidului de către mușchiul cardiac, de care depinde acțiunea sa terapeutică este funcție de fracțiunea „liberă" (36).

Controlul medicamentelor digitalice

Cu ajutorul RIA a fost testată absorbția intestinală a produselor tabletate de producători diferiți, observîndu-se diferențe de aproape un ordin de mărime (37). Aceste observații au dus la concluzia că printre parametrii care definesc un medicament trebuie inclusă și *biodisponibilitatea* la om (1, 38), care poate fi testată și prin metode *in vitro*, cum este determinarea ratei de dizolvare a digoxinei din tablete (39).

13.2. ANTIBIOTICE

13.2.1. INTRODUCERE

Dezvoltarea metodelor RIA pentru cantificarea antibioticelor (40, 41, 42, 43) oferă clinicianului posibilitatea să individualizeze dozele și să sporească astfel eficacitatea și securitatea farmacoterapiei. Metodele analitice clasice și determinările microbiologice nu sînt nici suficient de sensibile și nici specifice pentru a permite cantificări corecte.

Majoritatea antibioticelor au greutate moleculară mică (200—500) și de aceea, pentru a obține antiseruri specifice este necesar să fie cuplate cu

Scanned with OKEN Scanner

o proteină. Antibioticele aminoglicozidice devin imunogene prin cuplarea unei molecule mari ca serumalbumina sau tiroglobulina porcină. De exemplu, gentamicina şi kanamicina conţin grupări aminice reactive care pot fi legate la grupările carboxil ale proteinei (fig. II.13.3).

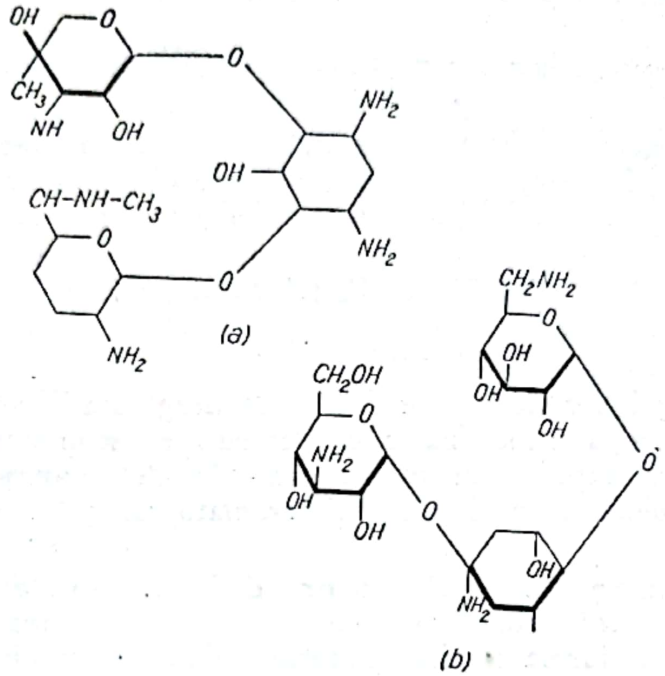


Fig. II.13.3. Formula chimică a gentamicinei C_1 (a) şi a Kanamicinei: $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$; Gm= 484 (b).

Lipsa grupării para-hidroxifenolice (tirozina) reprezintă un impediment pentru marcarea cu iod, rezolvat prin rodioiodurarea prealabilă a unui agent acilant (44, 45) şi conjugarea acestuia la molecula antibioticului.

13.2.2. TEHNICA RIA

Antiserul este preparat cu conjugate antibiotic-proteină şi la diluţia iniţială de 1 : 50 — 1 : 100 (finală de 1 : 500—1 : 1 000) leagă 30—50% din ligandul marcat.

Ligandul marcat. Deşi se folosesc şi trasori cu ^3H, majoritatea truselor cunoscute conţin trasori cu ^{125}I.

Standardul. Se foloseşte sulfat de gentamicină şi sulfat de kanamicină, pulbere, care se solubilizează la concentraţia de 100 µg/ml în tampon fosfat albuminat pentru soluţia mamă. Curba se construieşte cu doze progresive între 10 şi 10 000 ng/ml.

Condiţiile de incubare sînt adaptate necesităţilor clinice. Incubarea 10 minute la +40°C şi 20 de minute la +4°C reduce timpul de efectuare a tehnicii la 45—60 de minute.

Tehnica de separare uzuală este cu dublu anticorp.

Performanţele: folosind antiseruri adecvate, sistemele RIA pot diferenţia majoritatea antibioticelor. Cu toate acestea serurile anti-amikacină de exemplu, dau reacţii încrucişate de 100% şi cu kanamicina (ambele antibiotice aminoglicozidice), dar nu reacţionează cu gentamicina care aparţine aceleiaşi grupe (43).

Scanned with OKEN Scanner

Sensibilitatea tehnicii nu este critică, ţinînd seama de dozele administrate, în schimb precizia este absolut necesară şi s-au obţinut intraserie coeficienţi de variaţie de 4—5%, iar interserii de 8—10% (43).

Orice nou sistem RIA este validat cu ajutorul tehnicilor microbiologice uzuale (46) şi, cînd este posibil, şi prin cele radioenzimatice.

13.2.3. INDICAŢIILE MEDICALE ALE CANTIFICĂRII ANTIBIOTICELOR

Cantificarea este indicată în: stări septicemice în care se administrează antibiotice toxice în doze mari; în toate situaţiile în care se administrează antibiotice toxice şi în special la sugari, copii şi gravide.

13.3. MEDICAMENTE NEUROPSIHOTROPE

13.3.1. INTRODUCERE

Farmacologul doreşte să ştie despre un drog rata absorbţiei, distribuţia, metabolismul, excreţia şi localizarea sa. Pentru acest scop sînt necesare metode sensibile, specifice, rapide şi necostisitoare. Metodele anterioare celor radioimunochimice (colorimetria şi gaz-lichid-cromatografia) nu îndeplinesc aceste deziderate.

Odată creat un sistem RIA pentru digitoxină (5), avalanşa sistemelor similare pentru o varietate de substanţe cu acţiune farmacologică continuă să umple golurile farmacologiei şi farmacodinamiei moderne. Practic, nu deţinem un inventar al acestor sisteme; pentru completarea datelor în acest domeniu pot fi consultate referate generale (47, 48) şi lucrări monografice (49). În tabelul II.13.3 este prezentată o încercare de sistematizare pe categorii a sistemelor RIA pentru agenţii farmacologici.

Tabelul II.13.3.

Categorii de agenţi farmacologici pentru care au fost create sisteme RIA (listare orientativă, provizorie)

Categoria	Substanţa	Referinţe
Glicozide cardiotonice	Digitoxina	(4)
	Digoxina	
Antibiotice	Gentamicina	(40, 41)
	Kanamicina	(42, 43)
	Amikacina	
	Tobramicina	
Neuropsihotrope		
Hipnotice	Barbiturați	(50, 51)
Neuroleptice fenotiazine	amileridina	(47)
	meperidina	
	clorpromazina	(52, 53)
Psihoanaleptice	Amfetamina (benzedrina)	(54, 55)
	Anafranil (clomipramina)	(56)
Psihodisleptice	derivaţi morfinici	(51, 57, 58)
	lizergamina	(59)
Anticonvulsivante	Fenitoina (difenilhidantoina)	(60, 61, 62, 63)
Curarizante	Tubocurarina	(51)

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

13.3.2. TEHNICI DE DOZARE

Spectrofotometria (64, 65, 66, 67) și gaz-lichid-cromatografia (68, 69, 70, 71) sînt folosite astăzi pentru validarea sistemelor RIA, ele nu pot fi utile însă în scopuri clinice sau pentru studii de farmacodinamie.

13.3.3. RADIOIMUNOANALIZA SUBSTANȚELOR NEUROPSIHOTROPE

Antiserul. Obținerea unor antiseruri specifice pentru substanțe neantigenice, cu greutate moleculară de 200—300, lipsite de gruparea hidroxifenolică (fig. II.13.4) pune aceleași probleme ca și glicozidele cardiotonice sau substanțele cu acțiune antimicrobiană. Antiserurile obținute cu conjugatele derivat ester barbituric-proteină au afinitate maximă pentru barbital, pentobarbital, fenobarbital și secobarbital (51), substanțe care diferă între ele numai prin substituenții la C_5. Serurile anti-conjugate morfină-proteină conțin anticorpi cu afinitate egală și pentru codeină, dar fac distincția de heroină și normorfină; mai greu de diferențiat este metabolitul urinar morfină-3-monoglucuronat (51).

Trasorul. Conjugarea derivaților carboximetil cu copolimeri ai tirozinei permit marcarea cu ^{125}I, înlocuindu-se treptat radioizotopii ^{3}H și ^{14}C folosiți în primele lucrări.

Standardul. La elaborarea protocoalelor de preparare a soluțiilor standard se ține seama de puritatea substanței, de solubilitatea sa în soluțiile apoase și de condițiile (temperatură, durată) de conservare.

Tehnica de separare nu diferă de alte sisteme; sînt folosite după condițiile locale tehnica cu dublu anticorp, faza solidă sau cărbune-dextran.

Performanțe

Specificitatea sistemelor RIA pentru majoritatea drogurilor nu poate fi comparată cu cea a steroizilor, în sensul că antiserurile recunosc o gamă întreagă de compuși similari. De aceea este necesar să se știe ce medicament a luat bolnavul, ceea ce nu totdeauna este posibil.

Sensibilitatea este în general de ordinul microgramelor dar este suficientă dacă ne gîndim la dozele uzuale administrate.

Exactitatea este validată cu ajutorul metodelor spectrofotometrice și gaz-lichid-cromatografie dar și cu ajutorul RIA prin corelarea valorii concentrației serice cu doza administrată.

Precizia este similară altor sisteme.

13.3.4. APLICAȚII CLINICE ȘI REZULTATE

Producția explozivă a substanțelor cu acțiune farmacologică, naturale sau de sinteză, folosirea irațională și chiar abuzivă a lor, la care se adaugă interesul farmacologului de a cunoaște circuitul în organism al unei noi substanțe, constituie argumente suficiente pentru a justifica efortul de a realiza sisteme de analiză rapide, precise și necostisitoare.

Pentru clinician, interesul principal constă în supravegherea cu ajutorul determinărilor RIA, a efectelor terapeutice (48, 53, 56, 61, 62, 63). De exemplu, se admite că la concentrația serică de 10—20 μg hidantoină/ml condițiile terapeutice sînt optime (62, 72). La concentrații de peste 20 μg/ml apar efecte toxice, care adesea sînt atribuite dozei insuficiente de anticon-

vulsivant deoarece în timpul stării toxice pot apărea crize cu convulsii. Intervalul concentraţiilor optimale prezintă variaţii interindividuale destul de largi (63, 72) şi este mult influenţat de administrarea concomitentă a altor substanţe (61, 73).

BIBLIOGRAFIE

1. **Beller G. A., Smith T. W.** — În: „Nuclear Medicine in vitro" (editat de B. Rothfeld), Lippincott Co., J. B., Philadelphia — Toronto, 1974, p. 179.
2. **Henderson R. R., Dessey Jr. P. O., Abelmann W., Stason W. B.** — Circulation, 1971, *44*, 177.
3. **Lely A. H., Van Enter C.** — Amer. Heart. J., 1972, *83*, 149.
4. **Oliver G. C. Jr., Parker B. M., Brasfield D. L., Parker C. W.** — J. Clin. Invest., 1968, *47*, 1 035.
5. **Smith T. W., Butler Jr. V. P., Haber E.** — New Engl. J. Med., 1969, *281*, 1 212.
6. **Smith T. W., Haber E.** — J. Clin. Invest., 1970, *49*, 2 377.
7. **Kosoviez J.** — Endokrynol. Pol., 1979, 30/5, 411.
8. **Butler V. P.** — New Engl. J. Med., 1970, *283*, 1 150.
9. **Smith T. W.** — Amer. Heart. J., 1971, *82*, 833.
10. **Oliver G. C., Parker B. M., Parker C. W.** — Amer. J. Med., 1971, *51*, 186.
11. **Butler V. P. Jr.** — Lancet, 1971, *1*, 186.
12. **Zeegers J. J. W., Maas J. H. J., Willebrands A. F.** — Clin. Chim. Acta, 1973, *44*, 109.
13. **Taubert K., Shapiro W.** — Amer. Heart. J., 1975, *89*, 79.
14. **Dwenger A., Friedel R., Trautschold I.** — În: Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest) 31. X.—4. XI. 1977.
15. **Lader S. R.** — În: Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31—X. 4. XI. 1977.
16. **Butler V. P. Jr., Chen J. P.** — Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 1967, *57*, 71.
17. **Smith T. W., Butler V. P. Jr., Haber E.** — Biochemistry, 1970, *9*, 331.
18. **Selden R., Smith T. W.** — Circulation, 1972, *45*, 1 176.
19. **Smith T. W.** — J. Clin. Invest., 1972, *51*, 1 583.
20. **Selden R., Klein M. D., Smith T. W.** — Circulation, 1973, *47*, 744.
21. **Ransom J. P.** — Practical competitive binding assay methods, Mosby Company The C. V., Saint Louis, 1976, pl. 76.
22. — Lab. World, Clin. Lab. Reference, Sept. 1976.
23. **Chamberlain D. A., White R. J., Howard M. R., Smith T. W.** — Br. Med. J., 1970, *3*, 429.
24. **Beller G. A., Smith T. W., Abelmann W. H.** şi colab. — New. Engl. J. Med. 1971, *284*, 989.
25. **Evered D. C., Chapman C.** — Br. Heart. J., 1971, *33*, 540.
26. **Fogelman A. M., Lamont J. T., Finkelstein S.** şi colab. — Lancet, 1971, *2*, 727.
27. **Hoeschen R. J., Proveda V.** — Can. Med. Assoc. J., 1971, *105*, 170.
28. **Lader S., Bye A., Marsden P.** — J. Clin. Pharmacol., 1972, *5*, 22.
29. **Tisalo E., Dahl M., Sunquist H.** — J. Clin. Pharmacol., 1973, 7, 219.
30. **Park H. M., Chen I. W., Manitasas G., Lowey T., Saenger E. L.** — J. Nucl. Med., 1973, *14*, 531.
31. **Whiting B., Sumner D. J., Goldberg A.** — Scot. Med. J., 1973, *18*, 69.
32. **Shapiro B., Kollmann G. J., Heine W. J.** — Sem. Nucl. Med., 1975, *5*, 205.
33. **Wettrell G.** — Acta Paediat. Scand., 1976, Suppl. 257.
34. **Royers M. C., Willerson J. T., Goldblatt A., Smith T. W.** — New Engl. J. Med., 1972, *287*, 1 010.
35. **Lukers D. S., De Martino A. G.** — J. Clin. Invest., 1969, *48*, 1 041.
36. **Lüllmann H., van Zwieten P. A.** — J. Pharm. Pharmacol., 1969, *21*, 1.
37. **Lindenbaum J., Mellow M. H., Blackstone M. D., Bulter Jr. V P.** — New. Engl. J. Med., 1971, *285*, 1 344.
38. **Shaw T. R. D., Howard M. R., Hamer J.** — Lancet, 1972, *2*, 303.

Scanned with OKEN Scanner

39. **Lindenbaum J., Butler Jr. V. P., Murphy J. E., Cresswell R. M.** — Lancet, 1973, *1*, 1 215.
40. **Lewis J. E., Nelson J. C., Elder H. A.** — Nature (New Biol.) 1972, *239*, 214.
41. **Berk L. S., Lewis J. E., Nelson J. C.** — Clin. Chem., 1974, *20*, 1 159.
42. **Lewis J. E., Nelson J. C., Elder H. A.** — Antimicrob. Agents Chemother, 1975, *7*, 42.
43. **Lewis J. E., Nelson J. C.** — În: „Handbook of Radioimmunoassay" (editat de G. E. Abraham), Marcel Dekker Inc., New York-Basel, 1977, p. 743.
44. **Bolton A. E., Hunter W. M.** — Biochem. J., 1973, *133*, 529.
45. **Rudinger J., Ruegg U.** — Biochem. J., 1973, *133*, 538.
46. *** * *** — Farmacopeea română, ed. a IX-a, Ed. medicală, București, 1976, p. 420.
47. **Vunakis H. V., Freeman D. S., Gjika H. B.** — Chem. Path. Pharmacol., 1975, *12*, 379.
48. **Marks V., Morris B. A., Teale J. D.** — Brit. Med. Bull., 1974, *30*, 80.
49. **Sunshine I., Mule S J., Willette R. E.** — „Immunoassay for drugs subject to abuse", Chemical Rubber Company, Cleveland, 1974.
50. **Spector S., Flynn E. J.** — Science, 1971, *174*, 1 036.
51. **Spector S.** — În: „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, vol. 2, p. 233.
52. **Shostak M.** (citat de **Marks V., Morris B. A., Teale J. D.** — Brit. Med. Bull., 1974, *30*, 80.
53. **Marks V., Lindup W. E., Baylis E. M.** — Adv. clin. Chem., 1973, *16*, 47.
54. **Cheng L. T.** și colab. — Febs Lett., 1973, *36*, 339.
55. **Ransom J. P.** — Practical competitive binding assay methods, Mosby Company, The C. V., Saint Louis, 1976, p. 77.
56. **Read G. F., Riad-Fahmy D.** — În: „Internat. Symp. on „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", Berlin (vest), 31. X—4. XI. 1977.
57. **Spector S., Parker C. W.** — Science, 1970, *168*, 1 347.
58. **Adler F. L., Liu C. T.** — J. Immunol., 1971, *106*, 1 684.
59. **Taunton Rigby A., Sher S. E., Kelley P. R.** — Science, 1973, *181*, 165.
60. **Tigelaar R. E.,** — Clin. chim. Acta., 1973, 43, 231.
61. **Kutt H., Penry J. K.** — Arch. Neurol., 1974, *31*, 283.
62. **Lund L.** — Arch. Neurol., 1974, *31*, 289.
63. **Hichens A., Dunlop A.** — Lancet, 1975, *2*, 247.
64. **Goldbaum L. R.** — J. Pharmacol. Exp. Ther., 1948, *94*, 68.
65. **Elert B., Cohen E. N.** — Amer. J. Med. Technol., 1962, *28*, 125.
66. **Cohen E. N.,** — J. Lab. Clin. Med., 1963, *61*, 338.
67. **Kupferberg H. J., Burkhalter A., Way E. L.** — J. Pharmacol., Exp. Ther., 1964, *145*, 247.
68. **Parker K. D., Kerk P. L.** — Anal. Chem., 1961, *33*, 1 378.
69. **Martin H. F., Driscoll J. L.** — Anal. Chem., 1966, *38*, 345.
70. **Anders** — Anal. Chem., 1966, *38*, 1 945.
71. **Wilkinson G. R., Way E. L.** — Biochem. Pharmacol., 1969, *18*, 1 435.
72. **Bochner F., Hooper W. D., Tyrer J. H., Eadie M. J.** — J. Neurol., Neurosurg. Psychiat., 1972, *35*, 873.
73. **Houghton G. W., Richens A.** — J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1974, *37*, 275.

Scanned with OKEN Scanner

14

ERITROPOETINA

14.1. CONSIDERAȚIUNI GENERALE

Eritropoetina (Epo) sau factorul de stimulare al eritropoezei (ESF = erythropoiesis stimulating factor) este un hormon glicoproteic cu rol reglator al eritropoezei la animalele superioare (1, 2, 3).

14.2. LOCUL DE SINTEZĂ

A fost stabilit încă de acum un sfert de veac că sinteza Epo are loc în rinichi (4), intervenția factorilor extrarenali în biosinteză este încă obiect de cercetare (5, 6).

Natura chimică. Epo este o glicoproteină alcătuită din aproximativ 70% proteine și 30% hidrați de carbon dintre care 10,8% acid sialic (7). Epo umană nativă are GM de 46 000 daltoni și este structurată sub forma unui lanț unic (8, 9); după desializare GM este de 41 000 daltoni (8, 9).

14.3. FUNCȚIA

Celula țintă a acțiunilor Epo este celula hematopoetică precursoare sau mai exact celula epo-angajată, pe care o determină să se diferențieze în cea mai tînără celulă eritroidă cu nucleu, probabil proeritroblastul (1, 2, 3).

În celula Epo-angajată, hormonul induce sinteza hemoglobinei (Hb) prin intermediul RNA specific esențial pentru producerea Hb și a altor componente din țesutul hematopoietic (1, 2, 3). Efectul Epo se exercită și la nivelul elementelor diferențiate ale țesutului hematopoietic, producînd intensificarea activității de proliferare și de maturare (3, 10). Epo crește masa de lichide în organism în stări de hipoxie (2), crește captarea fierului în hematii (11), crește sinteza acizilor nucleici și a Hb (12).

Scanned with OKEN Scanner

14.4. METODA DE CANTIFICARE

În *metodele biologice „in vivo"* sînt urmărite ca metameri ai acţiunii Epo: creşterea masei eritrocitare prin măsurarea hematocritului, creşterea concentraţiei Hb, numărul reticulocitelor (13, 14) şi încorporarea ^{59}Fe în hematii la animalul întreg (15) sau hipofizectomizat (16).

În *metodele biologice „in vitro"* este măsurată acţiunea Epo cu ajutorul încorporării ^{59}Fe în hem în culturile de măduvă osoasă umană sau de animal. Doza minimă detectabilă prin ambele categorii de metode este de 50 mU-E.

Dificultăţile de purificare a Epo au întîrziat stabilirea unităţilor biologice de hormon. Unitatea de activitate biologică a Epo este o unitate derivată. A fost stabilită mai întîi o unitate standard ca efectul biologic produs asupra eritropoiezei la şobolan în inaniţie de 5 μM de cobalt sub formă de $CoCl_2$. Clorura de cobalt induce sinteza endogenă a Epo. Unitatea de activitate biologică a primului preparat standard, Epo de oaie, numit primul preparat de referinţă internaţional (I — IRP) a fost definită ca reprezentînd 0,05 mg din acest preparat cu activitate specifică de 23 U/mg (17, 18, 19). La epuizarea stocului, standardul I a fost înlocuit cu standardul II cu o unitate Epo pe 1,48 mg Epo izolată din urina umană.

14.5. METODE IMUNOCHIMICE

Cu ajutorul serurilor precipitante anti-Epo (20, 21) a fost măsurată Epo prin tehnica inhibiţiei hemaglutinării (20, 22) cu sensibilitate de 1,7 mU (unităţi imunochimice).

Metodele biologice sînt laborioase şi puţin specifice iar metoda imunochimică este greu standardizabilă.

14.6. RADIOIMUNOANALIZA (RIA) ERITROPOETINEI

Construirea sistemelor RIA pentru Epo a implicat dificultăţi generate de procedeele complexe de purificare, de prezenţa unor precursori şi metaboliţi în preparatele cu stabilitate convenabilă dar mai puţin pure. Cîteva grupuri de cercetători au izbutit să construiască totuşi sisteme RIA omologe pentru măsurarea Epo în serul uman folosind Epo izolată din urină umană colectată de la persoane cu excreţie mare a hormonului (23, 24, 25, 26, 27, 28, 29).

14.6.1. IMUNOGENUL

Extracte din urină colectate de la pacienţi anemici, preparate prin ultrafiltrare prin membrane de colodiu cu activitate specifică de aproximativ 20 U-Epo/mg sînt injectate la iepuri după emulsionare în adjuvant complet, în doze de 10 mg la intervale de 3—4 săptămîni. În cursul imunizărilor, iepurii inoculaţi prezintă anemie tranzitorie, prin reacţia încrucişată a anticorpilor anti-Epo umană cu Epo endogenă (24, 28). Antiserurile conţin anticorpi anti-Epo dar şi antiproteine contaminante. Unul dintre antiserurile cele mai adecvate a fost folosit în RIA la o diluţie finală de

Scanned with OKEN Scanner

1 : 10^6 (28), diluţie la care interferenţa proteinelor contaminante a putut fi anulată (28).

14.6.2. ERITROPOETINA MARCATĂ

Un preparat foarte purificat de Epo izolată din urina umană cu activitate specifică de aproximativ 8 000 U-Epo/mg (30) a fost marcată cu ^{125}I prin metoda cu cloramină-T cu activitate specifică de aproximativ 100 μCi/μg (28). După purificare pe Sephadex G-50, ^{125}I-Epo a fost utilizată în sistem RIA.

14.6.3. PREPARATUL DE REFERINŢĂ

Epo din urina umană cu activitate specifică de 8 000 U. E/mg sau de 9 000—12 000 U. E./mg (I-IREP-Eritropoetină) obţinută de la Institutul Naţional pentru Standarde Biologice şi Control, Londra sau de la Division of Blood Diseases and Resources, National Heart and Lung Institute, Bethesda, S.U.A., este folosită ca preparat de referinţă (28, 29, 30). Diluţii seriate între 0,1 şi 100 mU-Epo/ml permit construirea unei curbe doză-răspuns.

14.6.4. PROBELE BIOLOGICE

Plasmă sau ser uman recoltat şi conservat în condiţii similare şi altor sisteme RIA cu deosebire că se recomandă măsurarea simultană a concentraţiei Hb.

14.6.5. MEDIUL ŞI CONDIŢIILE DE INCUBARE

Diluarea şi incubarea reactivilor se face în tampon fosfat 0,05 M, pH 7,5 cu 5% albumină serică umană. Temperatura de incubare este 4°C şi timpul de contact al reactivilor 4—5 zile (29). Pentru separarea fracţiunii legate de cea liberă se foloseşte tehnica cu dublu anticorp (29).

14.6.6. PERFORMANŢE

Sistemul RIA-Epo uman este specific pentru om, Epo de oaie şi de iepure nu interferează în sistem la doze de 1 000 mU-Epo-.

Sensibilitatea sistemului este de 1 mU-Epo/ml.

14.6.7. ASPECTE CLINICE

Debutul sintezei Epo la fătul uman este semnalat din săptămîna a 32-a de gestaţie odată cu mecanismul eritroreglator.

Perfecţionarea metodelor de cantificare ale Epo au permis concluzia că sinteza Epo este un proces continuu, nu un produs sintetizat „la cerere" de exemplu în stări de hipoxie.

Există un raport de proporţionalitate între gradul hipoxiei tisulare şi concentraţia E în ser şi în urină. Cantitatea de Epo din urină de 10 ori mai mare decît cea din ser datorită absorbţiei Epo pe hematii, de aceea concentraţia hormonului în ser este invers proporţională cu hematocritul (6).

Scanned with OKEN Scanner

În stare fiziologică, Epo crește cînd scade tensiunea parțială a oxigenului, de exemplu la persoanele care trăiesc la altitudini mari și scade în perioada de adaptare la altitudine joasă.

Creșterea patologică a Epo se observă în aproape toate formele de anemie.

14.6.8. REZULTATE

În tabelul II 14.1.1. sînt prezentate valorile Epo serice obținute prin RIA la persoane normale și în unele stări patologice.

Tabelul II.14.1

Concentrația eritropoetinei în ser comparativ cu concentrația hemoglobinei (după 28)

Grup	Număr	Concentrația Hb (media) g/100 ml	Eritropoetina mU/ml ($\bar{X} \pm D.S$)
Normali			
Bărbați	311	15,1	4,9 ± 0.2
Femei	457	13,6	4,3 ± 0,2
Anemie feriprivă	37	9,0	32,3 ± 5,4
Policitemie	30	16,8	8,9 ± 0,9
Boli renale — stadiul terminal	19	6,4	211,0 ±21,0

BIBLIOGRAFIE

1. **Gordon A. S., Zanjani E. D.** — In: „Regulation of Hematopoiesis" (editat de A. S. Gordon) Appleton-Century-Crofts New York, 1970, v. 1, p. 413.
2. **Krantz S. B., Jacobson L. O.** — „Erythropoietin and the Regulation of Erythropoiesis", Univ. of Chicago Press, Chicago, Illinois, 1970.
3. **Gordon A. S.** — In: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow), North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, v. 2B, p. 1103.
4. **Jacobson L. O., Goldwasser E., Fried W., Plzak L.** — Nature (London), 1957, *179*, 633.
5. **Baciu I., Dorofteiu M., Olteanu A., Pavel T., Daniello A.** — Fiziol. Norm. Patol., 1973, *19*, 127.
6. **Baciu I.** — „Homeostazia Oxigenului", Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1980.
7. **Goldwasser E., Kung C. K.-H.** — Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1971, 68, 697.
8. **Goldwasser E., Kung K. -H.** — Fed. Proc., 1971, *30*, 1 128.
9. **Goldwasser E.** — In: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow), North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, v. 2 B, p. 1 091.
10. **Krantz S. B., Goldwasser E.** — Biochim. Biophys. Acta, 1965, *103*, 325.
11. **Fried W., Plzak L., Jacobson L. O., Goldwasser E.** — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1957, *94*, 237.
12. **Necheles T. F., Schechan R. G., Meyer H. J.** — Ann N. Y. Acad. Sci., 1968, *149*, 449.
13. **Erslev A. J.** — Blood., 1953, 8, 349.
14. **Borsook H., Graybiel A., Keighley G., Windsor E.** — Blood, 1954, *9*, 734.
15. **Plzak L. T., Fried W., Jacobson L. O., Bethard W.** — J. Lab. Clin. Med., 1955, *46*, 671.

Scanned with OKEN Scanner

16. **Garcia J. F., van Dyke D. C.** — J. Appl. Physiol., 1959, *14*, 233.
17. **Bangham D. R.** — In: „Erythropoiesis" (editat de L. O. Jacobson și M. Doyle), Grune Stratton, New York, 1962, p. 23.
18. **Cotes P. M., Bangham D. R.** — Bull. W. H. O., 1966, *35*, 751.
19. **Cotes P. M.** — In: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S.A. Berson și R. S. Yalow) North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, v. 2B, p. 1110.
20. **Lange D. R., McDonald L. F., Jordan T.** — J. Lab. clin. Med., 1969, *73*, 78.
21. **Baciu I., Dorofteiu M., Olteanu A., Vasile V.** — Fiziol. Norm. Patol., 1971, *17*, 203.
22. **Lange R. D.** — In: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology: (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow), North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, v. 2B, p. 1124.
23. **Fisher J. W., Thompson J. E., Espada J.** — Israel J. Med. Sci., 1971, *7*, 973.
24. **Garcia J. F.** — In: „Regulation of Erythropoiesis" (editat de A. S. Gordon, M. Condorelli și C. Peschle), The Publ. House, „Il Ponte", Milano, 1972, p. 132.
25. **Cotes P. M.** — In: „Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology" (editat de S. A. Berson și R. S. Yalow), North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, v. 2B, p. 1117.
26. **Garcia J. F.-In** — „Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Vienna, 1974, v. 1, p. 275.
27. **Lertora J. J., Dargon P. A., Rege A. B., Fisher J. W.** — J. Lab. Clin. Med., 1975, *86*, 140.
28. **Garcia J. F.** — In: „Methods of Hormone Radio-immunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press, New York, p. 421.
29. **Espada J., Fernandez L. M., Dorado M., Brandan N. C.** — IAEA Research Co-ordination Meeting in in vitro Procedures and Techniques, London, 29.XI.—3.XII.1976.
30. **Espada J., Gutnisky A.** — Acta Physiol. Lat. Am., 1970, *20*, 122.

Scanned with OKEN Scanner

15

MESAGERI INTRACELULARI: NUCLEOTIDE CICLICE ŞI PROSTAGLANDINE

15.1. cAMP şi cGMP

15.1.1. CONSIDERAŢIUNI GENERALE

În 1951, în cursul unor cercetări de stimulare a glicogenolizei cu adrenalină şi glucagon, Sutherland (1) observă că aceşti hormoni activează fosforilaza. Cîţiva ani mai tîrziu, acelaşi autor (2) arată că efectul hiperglicemiant este mediat de un factor cu greutate moleculară mică (dializabil), termostabil produs de fracţiuni corpusculare din omogenatele de ficat menţinute în prezenţa hormonilor.

În 1957, a fost descrisă sinteza unui adenin nucleotid unic cînd se tratează adenozin 5′-trifosfatul cu hidroxid de bariu (3). În acelaşi timp, Sutherland şi Rall (4) arată că preparatul sintetizat are aceleaşi proprietăţi biologice ca şi factorul termostabil. Ulterior, autorii sintezei confirmă structura acestei substanţe şi o descriu ca un fosfat ciclic; adenozin 3′, 5′ monofosfat ciclic (AMP ciclic). În anii care au urmat s-a stabilit că cAMP are un rol crucial în reglarea hormonilor, a enzimelor, a reacţiilor imunitare şi a fost identificat ca al doilea mesager în conceptul acţiunii hormonale propus de Sutherland (6) (fig. II.15.1).

Atît cAMP cît şi alt nucleotid ciclic natural — guanozin monofosfat ciclic (cGMP) sînt ubicuitari atît ca prezenţă în majoritatea ţesuturilor şi a lichidelor biologice la mamifere dar şi în bacterii cît şi ca activitate metabolică.

cAMP intervine în sinteza proteinelor, în glicogenoliză, în activitatea enzimelor, în lipoliză, în permeabilitatea membranelor, în steroidogeneză, în reacţiile imunitare şi în morfogeneză.

Scanned with OKEN Scanner

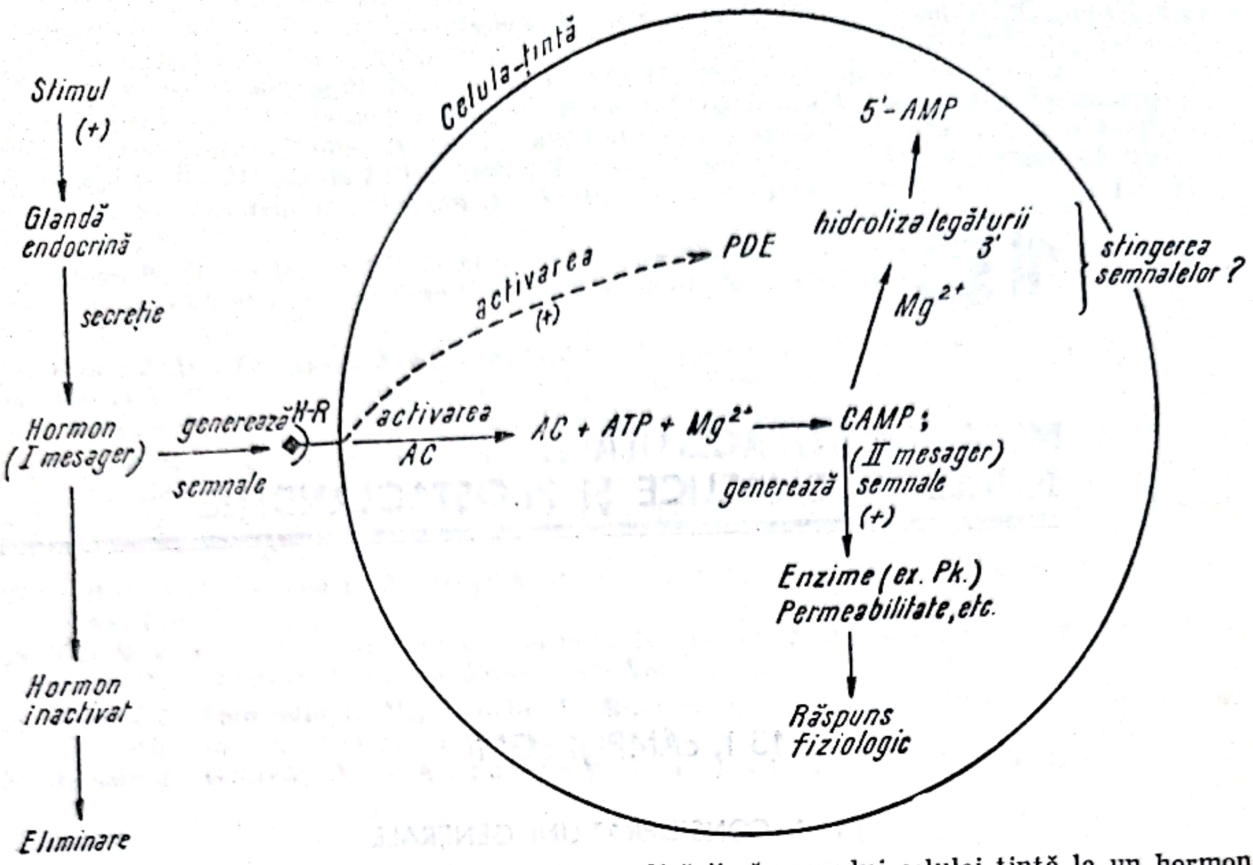
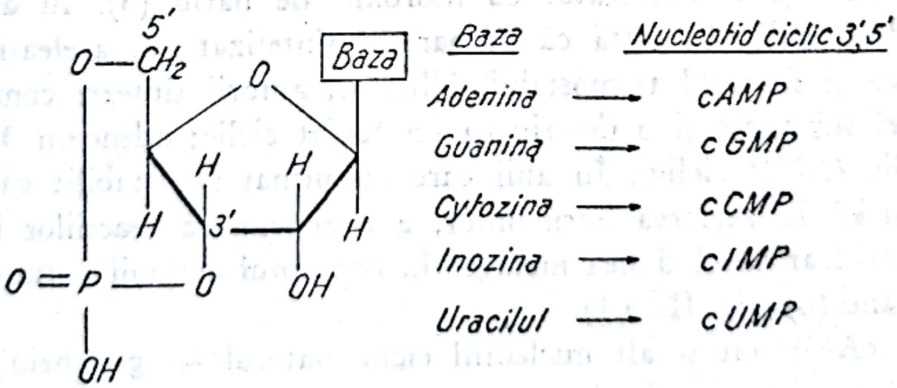


Fig. II.15.1 — Reprezentare schematică a realizării răspunsului celulei țintă la un hormon (primul mesager) via cAMP (al doilea mesager) și a interacțiunilor dintre cei doi mesageri biochimici (după 6).

HR = complex hormon-receptor; AC = adenilatciclaza; PDE = fosfodiesteraza; PK = proteinkinaze dependente de cAMP --- = acțiune cunoscută numai pentru unii hormoni catabolici ca insulina și glucagonul (7).

15.1.2. FORMULA CHIMICĂ

Sînt cunoscute cinci nucleotide ciclice naturale, care au comun riboza și un fosfat între carbonii 3′ și 5′ dar diferă prin baza azotată (purinică sau pirimidinică) (fig. II 15.2). Cele mai cunoscute sînt cAMP și cGMP.



Baza	Nucleotid ciclic 3′,5′
Adenina	cAMP
Guanina	cGMP
Citozina	cCMP
Inozina	cIMP
Uracilul	cUMP

Fig. II.15.2 — Formula chimică a celor cinci nucleotide ciclice naturale (8).

15.1.3. METODE DE CANTIFICARE

Pînă la obținerea unor antiseruri adecvate, a fost folosit un sistem de legare competitivă la o proteină naturală cu ^{3}H-cAMP ca trasor (9). În ultima decadă însă Hélène Cailla, în Franța (10, 11, 12, 13, 14) și Steiner în S.U.A.

Scanned with OKEN Scanner

(15, 16, 17, 18) izbutesc să construiască sisteme RIA pentru cAMP şi cGMP folosind derivaţii ioduraţi ca trasori.

15.1.4. SISTEME RIA PENTRU cAMP ŞI cGMP

Imunogenul este preparat prin conjugarea nucleotidului cu o proteină cu greutate moleculară mare. Pentru a creşte probabilitatea obţinerii unor antiseruri specifice sînt menajate inelele purinice şi legăturile diester 3′, 5′ ale cAMP şi ale cGMP. De aceea, nucleotidele ciclice sînt succinilate în poziţia 2′—O prin reacţia cu anhidridă succinică în apă în prezenţa trietilaminei (10, 11, 12, 14). Se obţin astfel succinil-AMP (ScAMP) şi succinil GMP (ScGMP) instantaneu cu randament de 100% (10, 18). Derivaţii succinilaţi sînt apoi cuplaţi cu proteină (serum albumină umană, hemocianină sau polimeri de poli-L-lizină) prin tehnica cu carbodiimidă.

Conjugatul ScAMP-albumină conţine 5—6 reziduuri cAMP per molecula de albumină (*18*).

Antiserul

Iepurii sînt injectaţi i.d. cu doze de 0,25 mg conjugat şi inoculările sînt repetate la intervale de 4—6 săptămîni pînă la obţinerea unor antiseruri convenabile. Antiserul este conservat diluat 1:100 în tampon acetat 0,05 M, pH 6,2 la —20°C.

Trasorul. Derivaţii ioduraţi sînt preferaţi celor tritiaţi datorită unui spor de sensibilitate cîştigat prin activitatea specifică a derivatului iodurat cu un ordin de mărime mai mare decît a derivatului tritiat. În plus, concentraţia anticorpului este mai redusă în sistemele RIA cu derivaţi ioduraţi (18).

Nucleotidele succinilate sînt cuplate cu tirozină prin reacţia carboxid — acid carbonic în prezenţa cloroformatului de etil. Apoi derivatul succinil-nucleotid-tirozin-metilester (ScAMP—TME sau ScGMP—TME) este radioiodurat prin metoda cu cloramina T şi purificat prin gel fitrare pe Sephadex G-10 sau prin cromatografie în strat subţire pe celuloză.

Standardul este cAMP sau cGMP de sinteză obţinut pe cale comercială. Curba este construită cu doze de 0,25—50 pmoli/ml în sistemul RIA convenţional şi cu doze de 0,02—200 pmoli/ml în sistem RIA cu nucleotide ciclice acetilate.

Sistem RIA cu nucleotide ciclice succinilate sau acetilate

Pentru sporirea sensibilităţii sistemelor de dozare se practică succinilarea (10, 11, 12, 13, 14) sau acetilarea (18) atît a standardului cît şi a probelor biologice.

Probele biologice

Ţesuturile congelate sînt omogenizate la 4°C în acid tricloracetic (TCA) 6% rece. Supernatantul este extras de 3 ori cu eter etilic evaporat sub curent de aer şi reziduul este dizolvat în tampon acetat de sodiu 0,05 M, pH 6,2 şi folosit direct pentru dozare.

Pentru a evita hidroliza nucleotidelor ciclice prin fosfodiesterază, ţesutul trebuie congelat imediat după prelevare.

Scanned with OKEN Scanner

Sîngele colectat pe heparină este centrifugat imediat la rece şi pentru a îndepărta substanţele care interferează cu cAMP (nu şi cu cGMP) se recurge la extracţia plasmei cu acid percloric 0,6 N v/v iar supernatantul este cromatografiat pe coloană de Dowex 50 W—X 8 (100—200 mesh), 4×8 mm, eluţie cu apă. cAMP eluează între 4 şi 8 ml. Această fracţiune este uscată la 60°C sub curent de aer şi resuspendată în tampon acetat.

Pentru cGMP, plasma este extrasă v/v cu TCA 10%, iar supernatantul este extras de 3 ori cu eter etilic evaporat la curent de aer şi reziduul redizolvat în tampon acetat.

Urina este folosită ca atare sau diluată 1:10 în tampon acetat.

Tehnica de separare a trasorului legat de cel liber constă din precipitare cu sulfat de amoniu sau cu alcool, dublu anticorp, polietilen glicol sau adsorbţie pe cărbune dextran.

Performanţele sistemului. Latura crucială a unui sistem RIA pentru nucleotide ciclice este selecţionarea antiserului, astfel încît reacţiile încrucişate să fie diminuate.

De exemplu, reacţia încrucişată a unui ser anti-cAMP sau anti-cGMP cu ATP nu trebuie să fie mai mare de 0,02% deoarece concentraţia ATP în ţesuturi este cu 4 şi cu 5 ordine de mărime mai mare decît a cAMP şi respectiv a cGMP (*18*). Diferitele antiseruri permit limite de detectabilitate între 0,02 şi 10 pmoli/ml (18).

15.1.5. ASPECTE CLINICE

Nucleotidele ciclice intervin în mecanisme subtile ale reglării metabolice. Date mai consistente se referă în special la cAMP. În timpul sarcinii excreţia urinară a cAMP creşte între săptămînile 12 şi 36 de gestaţie, apoi atinge un platou de aproximativ 5 200 n moli adică de două ori mai mult faţă de valorile din afara sarcinii. În toxemia de sarcină netratată, cAMP scade la jumătate faţă de valoarea corespunzătoare vîrstei sarcinii (8) iar tratamentul cu hidralazină sau cu tiazină hidroclorică readuce nivelul cAMP la normal. Întrucît scăderea excreţiei cAMP pare să sugereze perturbări ale metabolismului unităţii feto-placentare se poate recomanda măsurarea cAMP ca un mijloc de monitorizare a efectelor terapiei în cursul sarcinii (8).

În cazurile cu deficit de STH izolat sau panhipopituitarism excreţia urinară a cAMP scade (tabelul II.15.1) dar această scădere nu este datorată numai insuficienţei STH deoarece a fost observată şi la copii cu deficit statural prenatal (8). În acest caz s-ar putea ca scăderea excreţiei urinare de cAMP să fie datorită unui alt hormon somatotropolactogen şi anume lactogenul placentar.

S-a demonstrat că AMP-ciclic mediază efectul fosfaturic al hormonului paratiroidian asupra tubului renal proximal (19).

Excreţia urinară a cAMP creşte în hiperparatiroidism atît normo- cît şi hipercalcemie în 90% din cazuri (tabelul II.15.2). Revenirea excreţiei urinare a cAMP după extirparea adenomului paratiroidian este folosită pentru a verifica reuşita actului chirurgical (8).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.15.1.

Excreţia cAMP în urina de 24 ore la copii normali şi la copii hipostaturali (referinţa 8)

Grup	Vîrsta ani	Nr. cazuri băieţi/fete	cAMP n moli/oră/m² ($\bar{x} \pm DS$)
Normali	3—14	10/6	238 ±14,6
Insuficienţa hipofizei anterioare	9—17	6/2	113 ± 8,3
Deficit izolat de STH	4—11	4/2	94 ±10,3
Deficit statural familial	5—13	1/6	193 ±38,7
Deficit de creştere cu debut prenatal	6—13	1/2	204; 142; 137

Tabelul II.15.2.

Excreţia cAMP şi cGMP în urina de 24 ore la adulţi normali şi la bolnavi cu tulburări ale metabolismului calcic (referinţa 8)

Grup	cAMP	cGMP
	µmoli/g creatinină ($\bar{x} \pm DS$)	
Normali	2,50 ±0,13 (12)*	0,55 ±0,08 (13)
Hiperparatiroidism hipercalcemic	8,19 ±0,82 (8)	1,12 ±0,26 (6)
normocalcemic	4,28 ±0,66 (7)	0,75 ±0,25 (3)
Hipoparatiroidism	1,48 ±0,10 (10)	0,42 ±0,10 (5)

* număr cazuri

15.2. PROSTAGLANDINELE ŞI METABOLIŢII LOR

15.2.1. CONSIDERAŢII GENERALE

În 1930, doi ginecologi americani publică observaţia că uterul uman poate reacţiona la instilaţia de spermă umană proaspătă fie prin contracţii puternice, fie prin relaxare (20).

Independent, între anii 1933 şi 1935, Goldblatt în Anglia (21, 22) şi von Euler în Suedia (23, 24) studiază activitatea de stimulare a plasmei seminale umane asupra muşchiului neted. Von Euler prepară extracte lipidice din glandele veziculare ale masculilor de diferite specii şi observă că activitatea este asociată cu o fracţiune care conţine acizi graşi solubili. Factorul activ a fost numit „prostaglandină" (25), deoarece a fost identificat întîi în prostată (26). Astăzi denumirea este inadecvată, ţinînd seama de distribuţia acestor substanţe în ţesuturile şi lichidele biologice, dar nu mai poate fi schimbată.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste lucrări nu au stîrnit interesul cercetătorilor (27) iar studiile sînt reluate două decenii mai tîrziu. Începînd din anul 1960 literatura ştiinţifică se îmbogăţeşte cu o avalanşă de publicaţii multe dintre acestea conţinînd informaţii preliminare şi nu rareori contradictorii. De aceea, publicaţiile de sinteză şi simpozioanele asupra acestui subiect sînt o necesitate pentru cel ce doreşte să se orienteze în hăţişul observaţiilor obţinute pe o varietate de modele experimentale efectuate la om sau la diferite alte specii cu o diversitate de compuşi prostaglandinici naturali sau mai ales de sinteză (27—37). Numărul şi diversitatea studiilor sînt generate de amplele implicaţii ale prostaglandinelor în biologia umană şi animală.

15.2.2. NATURA CHIMICĂ

Prostaglandinele (PG) reprezintă un grup unitar de compuşi chimici înrudiţi. PG sînt acizi graşi nesaturaţi, hidroxilaţi, solubili. PG au o structură chimică neobişnuită; ele sînt acizi graşi cu 20 atomi de carbon (fig. II.15.3) derivate enzimatic din acizi graşi esenţiali prin ciclizare şi oxidare. Enzimele de conversie sînt prezente în multe ţesuturi, dar foarte active în glanda veziculară la ovine. Sînt cunoscute patru familii sau serii de PG naturale: două primare E şi F şi două secundare A şi B (fig. II.15.4).

Concentraţia redusă a PG în lichidele şi ţesuturile biologice (micrograme per ml sau g ţesut umed) a fost un obstacol în calea elucidării structurii, depăşit doar prin prelucrarea mai multor tone de vezicule seminale de oaie şi prin perfecţionarea metodelor de investigaţie. Precizarea structurii PG (37, 38) a fost urmată la scurt interval de realizarea sintezei PG şi a analogilor lor prin bioconversiune enzimatică (39).

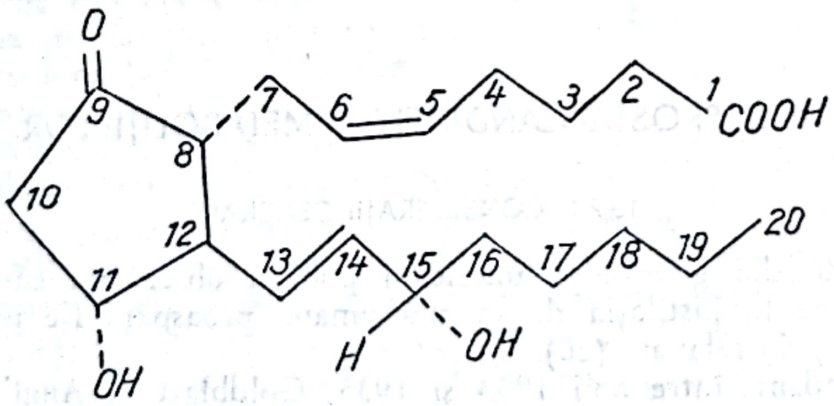


Fig. II.15.3 — Formula structurală generală a prostaglandinelor.

15.2.3. DISTRIBUŢIA PG

Separarea prin metoda cromatografiei în strat subţire asociată cu o metodă biologică pe muşchiul neted a permis identificarea PG în o serie de ţesuturi şi lichide biologice normale sau patologice (tabelul II.15.3).

Scanned with OKEN Scanner

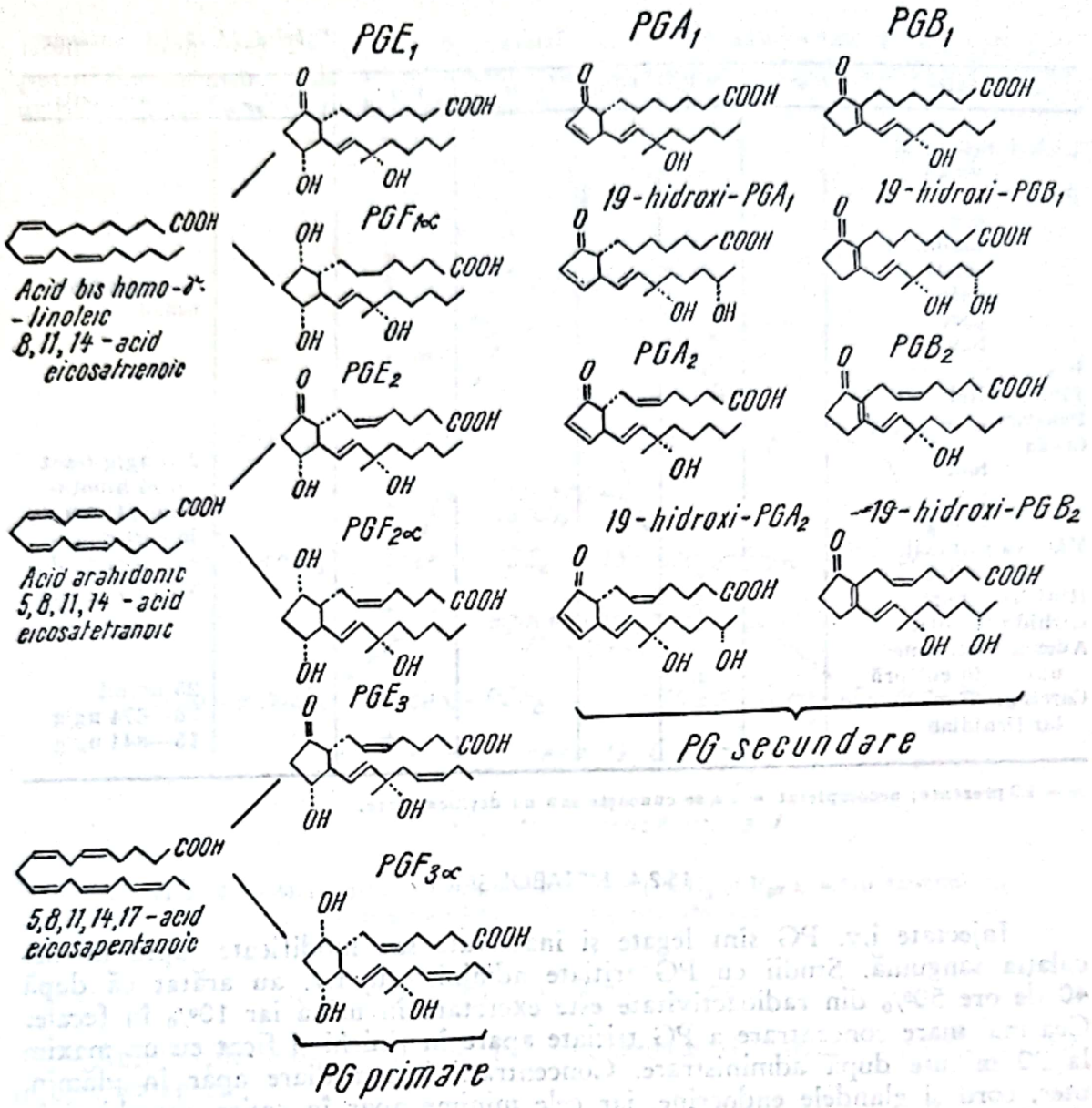


Fig. II.15.4 — Formula structurală a prostaglandinelor naturale și a precursorilor lor. Notația E, F, A și P semnifică seria compușilor E, F, A și B. Cifrele 1, 2, 3 arată numărul dublelor legături în lanțul lateral. Cei 6 membri ai familiilor E și F sînt consideraţi ca PG primare. ceilalţi membri sînt consideraţi secundari sau structuri derivate prin modificări chimice sau biologice.

Tabelul II.15.3.

Distribuţia prostaglandinelor primare în organismele animale (orientativ) (după referinţa 40 completată)

Sursa	PGE_1	PGE_2	PGE_3	$PGF_{1\alpha}$	$PGF_{2\alpha}$	$PGF_{3\alpha}$	Concentraţia
Plasmă umană	+	+	+	+	+		300—500μ g/ml
Plasmă ovină	+	+	+	+	+		
Vezicule seminale ovine	+	+	+	+	+		

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.15.3 (continuare)

Sursa	PGE_1	PGE_2	PGE_3	$PGF_{1\alpha}$	$PGF_{2\alpha}$	$PGF_{3\alpha}$	Concentrația
Lichid menstrual uman		+			+		
Plămîn							
om					+		
maimuță					+		
cobai					+		0,5 μg/g țesut umed
oaie		+			+		
porc					+		
bou					+	+	
Iris, oaie					+		
Timus, vițel	+						
Pancreas, bou		+			+		
Creier							200 ng/g țesut umed hipotalamus 100 ng/g în cortex, cerebral și măduvă 5—10 μg/g
bou					+		
pisică					+		
găină					+		
Măduva spinării, găină		+			+		
Rinichi, iepure		+			+		
Lichid amniotic	+	+		+	+		
Adenocarcinoame umane în cultură		+					25 ng/ml
Carcinomul medular tiroidian		+					36—674 ng/g
					+		15—844 ng/g

+ = PG prezente; necompletat = nu se cunoaște sau nu deținem date.

15.2.4. METABOLISMUL

Injectate i.v. PG sînt legate și inactivate sau modificate rapid în circulația sanguină. Studii cu PG tritiate administrate i.v. au arătat că după 40 de ore 50% din radioactivitate este excretată în urină iar 10% în fecale. Cea mai mare concentrare a PG tritiate apare în rinichi și ficat cu un maxim la 20 minute după administrare. Concentrații intermediare apar în plămîn, uter, cord și glandele endocrine, iar cele minime apar în creier, mușchi și în țesutul gras, cu concentrare tranzitorie în țesutul conjunctiv (41).

Predominant în plămîn și în cortexul renal, PGE_2 și PGF_2 sînt oxidate inițial în poziția C_{15}, rezultînd derivați 15-ceto, probabil inactivi. Reducerea enzimatică la legătura C_{13}—C_{14} produce majoritatea metaboliților circulanți ai PG și anume derivații 13, 14-dihidro-15-ceto (fig. II.15.5).

Aceștia, avînd semiviața relativ lungă ar trebui să alcătuiască compartimentul plasmatic dominant al PG (42). Treapta finală este oxidarea la C_{16} rezultînd acizi dicarboxilici considerați ca derivați tetranor (42).

Alături de familiile majore de PG naturale, a mai fost descris un compus derivat tot din endoperoxizi cu activitate vasoconstrictoare și de agregare a trombocitelor, denumit tromboxan (TX). TXA_2 are semiviața de mai puțin de un minut și se transformă într-un derivat acetal, TXB_2, a cărui măsurare permite estimarea activității TXA_2.

În plus, a mai fost evidențiat și un alt produs al endoperoxidazelor: PGI_2 sau prostaciclina, cu acțiune vasodilatatoare și de inhibiție a agregării

Scanned with OKEN Scanner

trombocitelor (44) PGI_2 este convertită enzimatic la 6-ceto. $PGF_{1\alpha}$ în mai puţin de un minut, de aceea măsurarea derivatului cu semiviaţă mai lungă ar putea permite estimarea prostaciclinei.

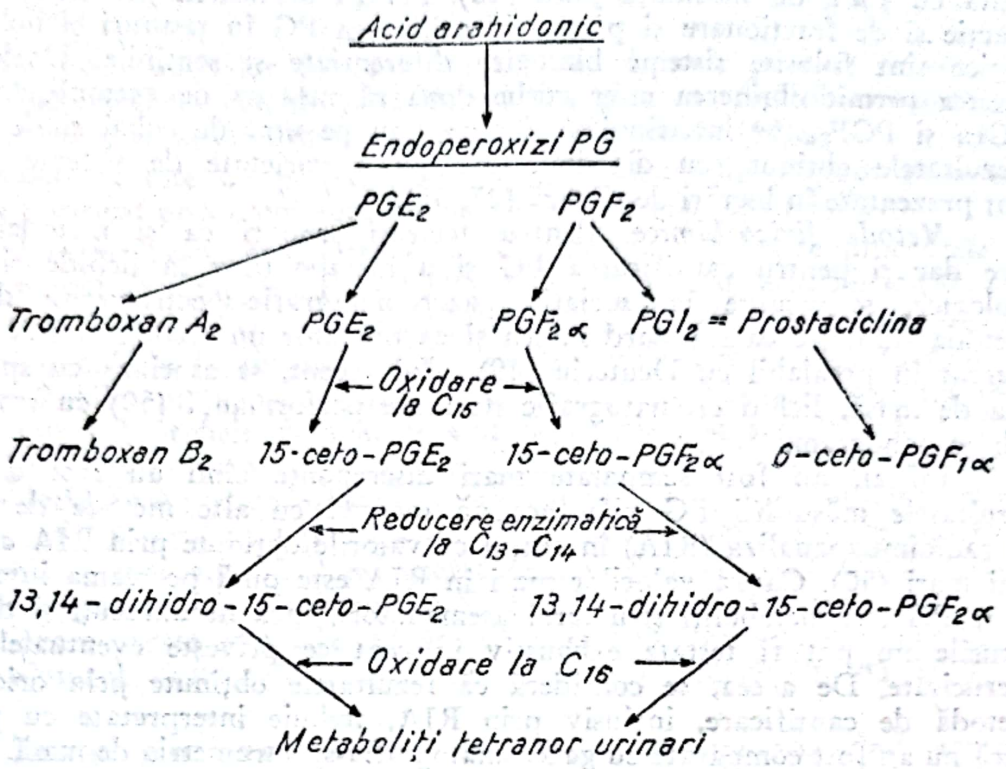


Fig. II.15.5 — Metabolismul prostaglandinelor (PGE_2 şi $F_{2\alpha}$), a tromboxanului şi prostaciclinei (PGI) (referinţa 42).

15.2.5. ACTIVITATEA BIOLOGICĂ

Activităţile individuale ale PG, numeroase şi variate, pot fi grupate în cinci categorii:

a) stimularea şi / sau relaxarea muşchiului neted;
b) acţiunea presoare şi / sau depresoare;
c) inhibiţia enzimelor şi / sau hormonilor;
d) potenţarea enzimelor şi / sau hormonilor;
e) stimularea sau inhibiţia agregării trombocitelor.

Spectrele activităţilor PG din grupele E şi F par să fie calitativ diferite de cele ale PG din grupele A şi B. Activităţile PGE şi PGF pe de o parte şi ale PGA şi PGB pe de altă parte sînt similare, diferenţele sînt de ordin cantitativ.

15.2.6. METODE DE CANTIFICARE

Metode biologice. Opţiunea pentru unul din sistemele de biodozare este în funcţie de tipul de PG studiată şi de concentraţia presupusă.

Au fost definite, de la descoperirea PG, mai multe unităţi PG. Unitatea PG — von Euler (45) reprezintă cantitatea care scade cu 30% pre-

Scanned with OKEN Scanner

siunea sanguină la iepure. În termeni de PGE_1, o unitate Euler = 4,5 μ g; o unitate Eliasson (46) = 10 μ g și o unitate Hawkins și Labrum (47) = 20 μ g. Tot în termeni de PGE_1 a mai fost definită unitatea — intestin echivalentă cu 1 μ g de substanță pură (48). Pentru urmărirea procedeelor de extracție și de fracționare și pentru identificarea PG în țesuturi și lichide biologice sînt folosite sisteme biologice diferențiate și sensibile. Unele dintre acestea permit obținerea unor curbe doză răspuns ca de exemplu măsurarea PGE_1 și $PGF_{2\alpha}$ pe intestinul de iepure, sau pe uter de cobai și de șobolan. Rezultatele obținute cu diferitele PG pe o varietate de sisteme biologice sînt prezentate în lucrări de sinteză (27, 35).

Metode fizicochimice. Pentru aceleași scopuri ca și metodele biologice dar și pentru cantificarea PG și a metaboliților în lichide și țesuturi biologice, se recurge la asociația gazcromatografie-spectrometrie de masă. Metoda folosește ca standard intern și ca purtător un analog al PG studiată, marcat în prealabil cu Deuteriu (49). Mai recent, se asociază cu spectrometria de masă, lichid cromatografic de mare performanță (50) cu sensibilitate sub un nanogram.

Inițial, au fost semnalate mari discrepanțe cînd au fost comparate rezultatele măsurării PG prin această metodă cu alte metode de exemplu cu radioimunoanaliza (RIA) în sensul că valorile obținute prin RIA erau mult mai mari (50). Cauza valorilor mari în RIA este pusă pe seama interferenței altor PG sau metaboliți structural asemănători, încă necunoscuți și deci antiserurile nu pot fi testate exhaustiv în ceea ce privește eventualele reacții încrucișate. De aceea, se consideră că rezultatele obținute prin oricare altă metodă de cantificare, inclusiv prin RIA, trebuie interpretate cu prudență dacă nu au fost comparate cu gazcromatografia-spectrometria de masă.

Totuși, întrucît metodele biologice sînt laborioase și greu standardizabile în condiții de lucru uzuale iar gaz-lichid cromatografia de mare performanță asociată cu spectrometria de masă implică aparatură costisitoare, metoda RIA se impune prin randamentul mare asociat cu sensibilitatea și acceptabila specificitate a sistemului.

Metode de cantificare comparabile cu RIA sînt viroimunoanaliza (51, 52) și radioreceptoranaliza (RRA) (53).

15.2.7. RADIOIMUNOANALIZA PG ȘI A METABOLIȚILOR

Primele seruri anti-PG izbutite sînt semnalate în 1970 (54). În deceniul care a urmat se înscriu progrese în construirea sistemelor RIA pentru PG din grupele primare F și E și secundare, A și B (42, 55, 63), în elaborarea sistemelor RIA pentru metaboliții PG (42, 64—69) și pentru noua PG — tromboxanul (70, 71). În plus, sistemele RIA pentru PG primare sînt folosite pentru estimarea indirectă a enzimelor lor de conversie (72, 73).

Imunogenul. PG primare din seria E (E_1, E_2), F ($F_{1\alpha}$, $F_{2\alpha}$), secundare A_1 și A_2, noul PG—TXB_2 sau metaboliți 15-ceto și 13, 14-dihidro-15-ceto-$PGF_{2\alpha}$ sînt conjugați cu proteine sau cu polimeri de polilizină prin una din metodele uzuale (carbodiimidă, morfolinil-carbodiimidă, etil cloroformat) (42). Randamentul încorporării PG la proteină este urmărit cu ajutorul compusului PG tritiat.

Antiserul se obține prin inocularea conjugatului PG proteină emulsionat în adjuvant complet și injectat intradermic; se administrează doze de

Scanned with OKEN Scanner

1,0 mg de conjugat per injecție. După cîteva luni (2—4 luni) pot fi obținute antiseruri convenabile. Antiserurile sînt testate în sistem RIA pentru reacția încrucișată cu toate PG cunoscute și cu metaboliții lor.

Trasorul

Majoritatea autorilor folosesc PG tritiate obținute pe cale comercială, dar sînt lucrări care semnalează folosirea PG și a metaboliților marcați cu ^{125}I sub forma derivaților tirozil-metil-ester (TME) amidă (67).

Standardul este un preparat de PG sau metaboliți obținut prin biosinteză și purificat prin cromatografie, disponibil pe cale comercială.

Probele biologice. Interferența cu alte PG face necesare procedeele de extracție și apoi de separare a PG de exemplu pe coloane de acid silicic (42, 71).

a. *Sîngele.* Se utilizează plasma heparinată centrifugată în interval de maximum o oră de la recoltare. Plasma este conservată la —20°C timp de maximum 7 zile, prelungirea timpului de conservare nu pare indicată (42). În acest interval probele de plasmă sînt decongelate și supuse extracției cu eter de petrol 3 : 1 (v/v) pentru îndepărtarea lipidelor neutre. Faza organică este îndepărtată și se adaugă la faza apoasă 3 ml solvent compus din acetat de etil, isopropanol și HCl 0,1 M, 3 : 3 : 1. După agitare viguroasă 2 × 15 sec. se mai adaugă 2 ml acetat de etil și 3 ml apă. După agitare, fazele sînt separate prin centrifugare. Faza organică este transferată în eprubeta de dozare și este uscată la curent de aer la 55°C. Recuperarea este urmărită cu ajutorul compusului tritiat adăugat în volum de 50 µl la 1 ml plasmă.

b. *Țesutul* este prelucrat imediat după prelevare adăugînd tampon fosfat salin și eter de petrol 1 : 3 (v/v) și triturînd într-un omogenizator. Omogenatul este supus apoi extracției ca și plasma (42).

c. *Alte lichide biologice.* În lichidele biologice cu conținut proteic redus ca umoarea apoasă, mediile de cultură cu ser de vițel sub 25%, urina și LCR, PG pot fi măsurate direct fără extracție prealabilă. Albumina umană avînd capacitate mare de legare a PG trebuie îndepărtată din probele care o conțin în concentrație mare (42).

Mediul de incubare și tehnica de separare sînt similare cu alte sisteme RIA.

Performanțele sistemului RIA pentru PG și metaboliți

Sensibilitatea — Sistemele RIA convenabile detectează 10 pg PG per ml plasmă.

Specificitatea. Separarea cromatografică permite realizarea specificității de grup adică PGE—PGF—PGA nu și intragrup ($PGE_1 + PGE_2$; $PGF_{1\alpha} + PGF_{2\alpha}$; $PGA_1 + PGA_2$).

Pentru specificitatea intragrup sînt necesare antiseruri cu afinități diferite pentru membrii grupului (75, 76).

Deși PG active E și F sînt inactivate rapid în plămîn prin conversiune la derivați 15-ceto, derivați inactivi circulînd în concentrații de 30 de ori mai mari (semiviața mai lungă), totuși aceștia nu interferează în sistemele RIA pentru PG active (reacția încrucișată de 0,4%).

Dar PGA fiind convertită la PGB în ser (nu în plămîn) PGB și PGA eluează simultan la cromatografie și sistemul RIA măsoară ambele PG (42).

Scanned with OKEN Scanner

Acidul arahidonic se află în plasmă în concentrație de 7 μ g/ml dar interferența acestui acid gras precursor cu lanț lateral lung este neglijabilă ($1 : 10^5$) (42).

Verificarea prin biodozare: dozări paralele cu tehnica presiunii arteriale la pisică sau cu tehnica organului superperfuzat au dat rezultate concordante (42).

Verificarea prin cromatografie-spectrometrie de masă: rezultatele concordă dar există tendința la supraestimare a valorilor prin RIA (42), din motivele arătate (reacții încrucișate ale compușilor similari).

15.2.8. ASPECTE CLINICE

Domeniile majore cercetate includ: sistemul cardiovascular, fiziologia renală, digestivă, a aparatului de reproducere, metabolismul celular, sistemul nervos central și periferic, sistemul endocrin și sistemul imunitar (27—30, 40, 42, 77).

La om, modalitățile de abordare pot fi grupate în experiențe farmacologice, de administrare a PG, măsurarea PG active, a metaboliților și a enzimelor de conversie în stare normală și patologică, administrarea substanțelor cu rol regulator asupra PG (inhibitori, stimulatori, modulatori).

În tabelul II.15.4 sînt prezentate valorile PGE și PGF în plasmă la persoane normale și în plasma ombilicală, în sarcina la termen, după travaliu.

Tabelul II.15.4.

Valorile PGE și PGF în plasmă la persoane normale și în plasma ombilicală, în sarcina la termen, după travaliu

Grup	Sursa	PGE pg/ml	PGF pg/ml	Referința
Femei	Plasmă	316 ± 36	154 ± 35	(42)
Bărbați	Plasmă	478 ± 55	162 ± 19	
Travaliu spontan	Artera ombilicală	199 ± 27	80 ± 10	(78)
expulzie vaginală	Vena ombilicală	242 ± 25	88 ± 11	
cale chirurgicală	Artera ombilicală	74 ± 20	47 ± 5	
	Vena ombilicală	138 ± 31	52 ± 6	

Capitolul prostaglandinelor este o istorie care abia începe și numai spiritul de cooperare și de jertfă al cercetătorilor ar putea aduce lumină în noianul datelor de observație și ca urmare și speranțe pentru utilitatea PG în îmbogățirea mijloacelor terapeutice dar și a celor de prevenire a îmbolnăvirilor.

BIBLIOGRAFIE

1. Sutherland E. W. — In: „Phosphorus Metabolism" (editat de W. E. McElroy și B. Glass). John Hopkins Press, 1951, v. 1, p. 53.
2. Rall T. W., Sutherland E. W., Berthet J. — J. Biol. Chem., 1957, *224*, 463.
3. Cook W. H., Lipkin D., Markham R. — J. Amer. Chem. Soc., 1957, *79*, 3607.
4. Sutherland E. W., Rall T. W. — J. Amer. Chem. Soc., 1957, *79*, 3608.

Scanned with OKEN Scanner

5. Lipkin D., Cook W. H., Markham R. — J. Amer. Chem. Soc., 1959, *81*, 6198.
6. Sutherland E. W., Robison G. A., Butcher R. W. — Circulation, 1968, *37*, 279.
7. Sonne O. — In: „Cyclic Nucleotides and Calcium as Mediators of Cellular Function" (editat de H. Vapaatalo și T. Metsä-Ketelä), Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1980, p. 15.
8. Raij K. — In: „Cyclic Nucleotides and Calcium as Mediators of Cellular Functions" (editat de H. Vappaatalo și T. Metsä-Ketelä), Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1980, p. 87.
9. Gilman A. G. — Proc. Natl. Acad. Sci., S. U. A., 1970, *67*, 305.
10. Cailla H., Delaage M. A. — Anal. Biochem., 1972, *48*, 62.
11. Cailla H., Racine-Weisbuch M., Delaage M. A. — Anal. Biochem., 1973, *56*, 394.
12. Cailla H., Racine-Weisbuch M., Delaage M. A. — In: „Radio-immunoassay and Related Procedures in Medicine", IAEA, Viena, 1974, v. 2, p. 177.
13. Cailla H., Vannier C. J., Delaage M. A. — Anal. Biochem., 1976, *70*, 195.
14. Cailla H., Roux D., Delaage M. A., Goridis C. — Biochem. Biophys. Res. Com., 1978, *85*, 1503.
15. Steiner A. L., Kipnis D. M., Utiger R., Parker C. W. — Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1969, *64*, 367.
16. Steiner A. L., Parker C. W., Kipnis D. M. — J. Biol. Chem., 1972, *247*, 1106.
17. Steiner A. L., Pagliari A. S., Chase L. R., Kipnis D. M. — J. Biol. Chem., 1972, *247*, *1114*.
18. Steiner A. L. — In: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press New York, 1979, p. 3.
19. Chase L. R., Melson G. L., Aurbach G. D. — J. Clin. Invest., 1969, *48*, 1832.
20. Kurzrok R., Lieb C. C. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1930, *28*, 268.
21. Goldblatt M. W. — J. Soc. Chem. Ind. (Londra), 1933, *52*, 1056.
22. Goldblatt M. W. — J. Physiol. (Londra), 1935, *84*, 208.
23. Euler U. S. von — Arch. Exp. Pathol. Pharmakol., 1934, *175*, 78.
24. Euler U. S. von — J. Physiol. (Londra), 1935, *84*, 21 P.
25. Euler U. S. von — J. Physiol. (Londra), 1937, *88*, 213.
26. Euler U. S. von — Klin. Wochenschr., 1935, *14*, 1182.
27. Bergström S., Carlson L. A., Weeks J. R. — Pharmacol. Rev., 1968, *20*, 1.
28. Patel N. — Ann. Intern. Med., 1970, *73*, 483.
29. Sparks R. M., Calvin M. L. — Prostaglandins, 1973, *1*, G-1.
30. Brody M. J. — Prostaglandins, 1973, *3*, G-25.
31. Csapo A. I. — Prostaglandins, 1974, *4*, G-33.
32. Challis J. R. G. — Prostaglandins, 1974, *5*, G-45.
33. Shalita R. — Prostaglandins, 1975, *6*, G-57.
34. Bygdeman M., Bergström S. — Prostaglandins, 1976, *7*, G-65.
35. Ramwell P. W. (editor) — „The Prostaglandins", Plenum Press, New York, 1977, 359 p.
36. Förster W., Saremba B., Mentz P. (editori) — „Prostaglandins and Thromboxanes" (Proc. 3rd Internat. Symp. on Prostaglandins and Thromboxanes in the Cardiovascular System, Halle/Saale, G.D.R., May 5—7, 1980), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1981, 494 p.
37. Bergström S., Sjövall J. — Acta Chem. Scand., 1960, *14*, 1963.
38. Bergström S., Krabisch LL., Samuelsson B., Sjövall J. — Acta Chem. Scand., 1962, *16*, 969.
39. Kupiecki F. P. — Life Sci., 1965, *4*, 1811.
40. Hinman J. W. — Bioscience, 1967, *17*, 779.
41. Hansson F., Samuelsson B. — Biochem. Biophys. Acta, 1965, *106*, 379.
42. Jaffe B. M., Behrman H. R. — In: „Methods of Hormone Radioimmunoassay" (editat de B. M. Jaffe și H. R. Behrman), Academic Press, New York, 1979, p. 19.
43. Hamberg M., Svensson J., Samuelsson B. — Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1975, *72*, 2994.
44. Bunting S., Gryglewski R., Moncada S., Vane J. R. — Prostaglandins, 1976, *12*, 897.
45. Euler U. S. von — Skand. Arch. Physiol., 1939, *81*, 65.
46. Eliasson R. — Acta Physiol. Scand., 1959, *46*, (suppl. 158), 1.
47. Hawkins D. F., Labrum A. H. — J. Reprod. Fert., 1961, *2*, 1.
48. Bergström S., Krabisch L., Samuelsson B., Sjövall J. — Acta Chem. Scand., 1962, *16*, 969.
49. Samuelsson B., Hamberg M., Sweeley C. — Anal. Biochem., 1970, *38*, 301.
50. Frölich J. C. — In: „The Prostaglandins" (editat de P. W. Ramwell), Plenum Press, New York, 1977, v. 3, p. 1.

Scanned with OKEN Scanner

51. Andrieu J. M., Mamas S., Dray F. — Prostaglandins, 1974, *6*, 15.
52. Mitani M., Shoji S. — Prostaglandins, 1974, *8*, 67.
53. Kuehl F. A. jr., Humes J. L. — Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1972, *69*, 480.
54. Levine L., Van Vunakis H. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, *41*, 1171.
55. Caldwell B. V., Burstein S., Brock W. A., Speroff L. — J. Clin. Endocr. Metab., 1971, *33*, 171.
56. Levine L., Gutierrez-Cernosek R. M., Van Vunakis H. — J. Biol. Chem., 1971, *246*, 6782.
57. Dray F., Maron E., Tilson S. A., Sela M. — Anal. Biochem., 1972, *50*, 399.
58. Granström E., Samuelsson B. — FEBS Lett., 1972, *26*, 211.
59. Jaffe B. M., Smith J. W., Newton W. T., Parker C. W. — Science, 1971, *171*, 494.
60. Kirton K. T., Cornette J. C., Barr K. L. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, *47*, 903.
61. Stylos W. A., Rivetz B. — Prostaglandins, 1972, *2*, 103.
62. Zusman R. M., Caldwell B. V., Speroff L. — Prostaglandins, 1972, *2*, 41.
63. Yu S.-C., Burke G. — Prostaglandins, 1972, *2*, 11.
64. Levine L., Gutierrez-Cernosek R. M. — Prostaglandins, 1972, *2*, 281.
65. Stylos W. A., Burstein S., Rosenfeld J., Ritzi E. M., Watjon D. J. — Prostaglandins, 1973, *4*, 553.
66. Cornette J. C., Harrison K. L., Kirton K. T. — Prostaglandins, 1974, *5*, 155.
67. Ohki S., Hanyu T., Imaki K., Nakazawa N., Hirata F. — Prostaglandins, 1974, *6*, 137.
68. Ohki S., Imaki K., Hirata F. — Prostaglandins, 1975, *10*, 549.
69. Granström E., Kindahl H. — Thromboxane Res., 1976, *1*, 81.
70. Granström E., Kindahl H., Samuelsson B. — Anal. Lett., 1976, *9*, 611.
71. Granström E., Kindahl H., Samuelsson B. — Prostaglandins, 1976, *12*, 929.
72. Bauminger S., Zor U., Lindner H. R. — Prostaglandins, 1973, *4*, 313.
73. Pong S. S., Levine L. — In: „The Prostaglandins" (editat de P. W. Ramwell), Plenum Press, New York, 1977, v. 3, p. 41.
74. Jaffe B. M., Behrman H. R., Parker C. W. — J. Clin. Invest., 1973, *52*, 390.
75. Ritzi E. M., Srylos W. A. — Prostaglandins, 1974, *8*, 55.
76. Raz A., Schwartzmann M., Kenis-Wakshal R., Perl E. — Eur. J. Biochem., 1975, *53*, 145.
77. Clark M. R. — Endocrinol., 1982, *110*, 146.
78. Mitchell M. D., Aynsley-Green A., Lucas A., Menchini M., Sellers S. M., Turnbull A. C. — In: „Prostaglandins and Thromboxanes in the Cardiovascular System and in Gynecology and Obstetrics" (editat de W. Förster, B. Sarembe şi P. Mentz), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1981, p. 445.

Scanned with OKEN Scanner

COPRODUȘII METODELOR RIA ȘI SIMILARE

Încă înainte de dezvoltarea metodelor RIA, *hormonii marcați* erau folosiți pentru studiul circuitului lor în organismul uman (1, 2). Totuși, exigențele impuse de sistemele RIA în ceea ce privește puritatea, activitatea specifică și stabilitatea hormonilor marcați cu izotopi radioactivi, au stimulat dezvoltarea unor tehnologii simple și de mare randament pentru obținerea lor. În acest fel, hormonul marcat cu emițători gama sau beta a devenit un instrument la îndemîna cercetătorului. De aceea, marea majoritate a datelor de observație despre sinteza, circuitul hormonilor în organism, timpul de înjumătățire, relația lor cu țesuturile-țintă, transformările metabolice, rata excreției etc., se înscriu în literatura științifică după anul 1960 (3), anul inaugurării sistemelor RIA.

Serurile monospecifice antihormoni sînt folosite pentru studii imunohistochimice de citolocalizare a sintezei și stocării hormonilor dar și pentru studii de fiziologie, realizîndu-se cu ajutorul lor „ectomia" hormonală specifică *in vivo*. Există unele tentative teoretice (4) și practice (5) de extindere

Co-produșii metodelor cu radioliganzi
Aplicații și scop

Produsul	Aplicații	Scop
Hormonul marcat	— detectarea auto- și izoanticorpilor anti-hormoni și anti-substanțe hormonoide (precursori metaboliți)	diagnostic: rezistența la hormoni; procese autoalergice
	— timp de înjumătățire	științific
	— metabolism	terapie
	— excreție	
	— depistarea complexelor antigen-anticorp	științific fiziopatologic
	— depistarea țesuturilor receptoare	științific metodologic
Antiserul	— citolocalizarea sintezei și stocării hormonilor	științific
	— ectomia hormonală	științific (studiul retrocontrolului etc.) terapeutic (în hipersecreții hormonale)
Proteine transportoare (tranzine)	— studii asupra variației concentrației tranzinelor	științific: transportul hormonilor
Proteine	— studii asupra „normalității" țesuturilor receptoare	științific: interacțiunea cu țesuturi-țintă diagnostic: patologia țesutului receptor

Scanned with OKEN Scanner

a acestei ectomii selective în clinica umană pentru tratamentul hipersecreției unor hormoni ca hormonul de creștere la acromegali (5) sau cu ser anti-T_3 la pacienți cu tireotoxicoză (7).

Ideea de a folosi imunizarea pasivă de exemplu la canceroși sau terapia cu ser „specific" anti-celule canceroase în care anticorpul să funcționeze ca „glonte magic" după imaginea dată încă de Ehrlich, a început să fie experimentată în urmă cu două decenii (6).

Proteinele plasmatice utilizate ca reactiv în metoda radiocompetitivă au devenit ele însele obiectul unor studii de la care se așteaptă un val de informații referitoare la acest imens rezervor de hormoni steroizi și tiroidieni, care ar putea interveni în modul de acțiune al unor medicamente sau al unor toxice.

O mare varietate de *proteine receptoare* au fost izolate în ultimii ani. Acestea sînt folosite în scop practic, pentru măsurarea hormonilor în sistem de radioreceptor analiză (RRA). Receptorii o dată identificați și izolați servesc și studiilor de fiziologie a interacțiunii hormonilor cu țesuturile-țintă sau pentru detectarea proceselor patologice în aceste țesuturi.

În tabel sînt prezentați principalii coproduși ai metodelor cu radioliganzi și utilitatea lor.

BIBLIOGRAFIE

1. **Rothschild M. A., Bauman A., Yalow R. S., Berson S. A.** — J. Clin. Invest., 1957, *3*, 422.
2. **Skinner S. M., Clark R. E., Baker N., Shipley R. A.** — Amer. J. Phisiol., 1959, *196*, 238.
3. **Gurpide E.** — „Tracer Methods in Hormone Research", Springer — Verlag, Berlin, 1975, 188 p.
4. **Simionescu L.** — Stud. Cercet. Endocrinol., 1967, *18*, 319.
5. **Lazărev A. F.** — Pediatria, 1972, *3*, 24.
6. **Wiebsky E., Rose N. R., Shulman S.** — Cancer Res., 1956, *16*, 831.

Scanned with OKEN Scanner

RADIOIMMUNOASSAY OF HORMONES
ABSTRACT

The book "Radioimmunoassay of hormones" deals with the radioimmunological assay method and related procedures, with applications mainly in human medicine.

As a consequence of the continuous rafinement of the nuclear equipment and of the radiolabelled compounds, the radioimmunoassay (RIA) principle, established about two decades before, generated, in turn, an explosive methodological and technical development. At the same time, similar procedures were developed, as for example competitive protein binding assay (CPBA), immunoradiometric assay (IRMA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), fluoroimmunoassay (FIA), luminiscent immunoassay (LIA), radioreceptor assay (RRA), etc., with the fundamental and practical value of all but the last being almost unpredictable. In the newly discovered methods (a synthesis of our knowledge of physical chemistry, of biochemistry and of immunochemistry) there is combined an exquisite sensitivity of the radiochemistry techniques to a high degree of specificity of antibodies and of other binding proteins. The numerous fields of applications and the deep implications in fundamental and practical medicine and biology justified the Nobel price awarded in 1977 to the american investigator Rosalyn S. Yalow for the development of the RIA domain, and the highest national award offered to P. R. Ekins in England for the development of the CPBA methodology.

RIA is an "in vitro" method based on the competition between labelled and unlabelled substances for binding to specific antibody. Prior to the development of the RIA methods, no sensitive and specific techniques were available for measuring the peptide hormones in biological fluids. Unlike the thyroid and steroid hormones having attributes of structure and solubility that make them amenable to direct chemical measurement, the peptide hormones are not sufficiently individualized in these respects to permit their distinction from the jungle of serum proteins by classical chemical methods. The most important medical developments due to the new radioassay procedures are:

1. The measurement of the peptide hormones in unprocessed biological liquids at as low concentration levels as 10^{-9} to 10^{-15} gram, surpassing in sensitivity the classical biological methods with 4–6 orders of magnitude.

2. The extension of the radioassay techniques to the dosage of nonantigenic substances such as steroids, drugs, small peptides, thyronines, etc.

3. An "in vitro" measurement that can be carried out from practical standpoint, on several hundred to a thousand samples simultaneously, thereby opening new diagnosis sources, populational screening possibilities, drug industry applications, etc.

4. The premises for discoveries of new hormones, of various forms of the synthesized, stored or circulating hormones and of their metabolites.

At the present time, it is practically impossible to have an exhaustive list of the contributions of RIA and related procedures to the development of medicine (human and veterinary), biology, pharmacology. The number of the peptide hormones measured by these methods is higher than 50, but the whole list of the substances measured is longer than 500.

The body of this book is divided into two parts: in the first, the general aspects of RIA and related methods are described; in the second, the main applications in human medicine (fundamental and practical) are presented.

The general part is covered in six chapters. It begins with the principles and definitions of the competitive binding assay systems (RIA, CPBA, RRA), the nonradioisotopic assay systems (ELISA, FIA and LIA), and the noncompetitive system (IRMA). The next chapters contain the aspects of the use of radioisotopes in the RIA systems, the labelled compounds commonly used and the components of the antigen-antibody reaction in a RIA type of system. The assembly of the reactants and conditions for building up a RIA system as well as the quality control of the results are treated during the last two chapters. In this first part, the author introduces the reader to the intimate aspects of the building up of a new RIA system, trying to simplify as much as possible the approach of this new domain. For example, she tabulated an adapted classification of the polypeptide hormones on the basis of molecular weight. The molecular weight of polypeptide hormones is critical for many aspects of a RIA system. It is easy to observe the importance of the molecular size for the antibody production, for the selection of an adequate separation technique or for the purification of the tracer. Therefore, the author classified the polypeptide hormones into four groups (oligo-, poly-, macro- and mega-peptides) according to the molecular weight. And the molecular weight was grossly related to the necessity to prepare protein conjugates for the first group of peptides, or to the uselessness of certain separation techniques based on adsorbtion on powders for the last group. Another attribute of the peptide hormones emphasized in this part is the species specificity. Thi is important not only for the selection of the animal for producing antisera but yet more for the larger applicability of the human RIA systems on the biological and veterinary fields or conversely, to the use of animal source for those human hormones difficult to obtain (for example insulin or parathyroid hormone). The species specificity and structure communities of the peptide hormones may be followed on synoptic tables. The great diversity of the separation techniques represents an impediment for the students in the RIA field. This is the reason that these techniques were classified according to their basic principles and tabulated, specifying the particular application of each one. The new acquisitions concerning the structure and genetics of antibodies are treated from the radioimmunologist point of view. For example, the use of the radioactive tracers and of monospecific antisera may improve our knowledge of the antigen-antibody intimate reaction or, later, using genetic instruments it is possible to increase the homogeneity of the anti-hormone antibodies (i.e. monoclonal antibodies). Modalities of expressing results according to the W.H.O. recommendations as regards the Standard International (SI) system, or the international, national, regional and laboratory reference preparations, are other aspects described. The quality control procedures commonly used, the laboratory-clinics and inter-laboratory relationships as well as the automation steps and advantages complete the first (general) part. Special attention was paid to the strategies necessary to assess reproducible results. The procedures for the quality control of the RIA results are established taking into account

Scanned with OKEN Scanner

every link in the long chain binding the patient to the clinician and to the laboratory investigator.

In the second part, the RIA systems for the commonly used hormones and substances are successively treated as well as some of those somewhat "controversial" substances as for example vasotocin and melatonin or recently discovered (endorphines — enkephalines) and finally intracellular messengers (cyclic nucleotides and prostaglandins). The context of the RIA system for each hormone or substance is discussed according to a rather ambitious topics. By these topics, the author tried to contact biochemists, biophysicians and biologists not only with the subtleties of the individualized RIA systems but also with the physiopathology of the substance they have to handle. At the same time, the author tempted to inform the clinician and the pharmacologist regarding the special procedures for the dynamic tests and their resulting data. In order to facilitate an adequate option for the assay of a hormone (s) instead of all hormones involved in a feedback circuit, some hormones are presented as a complex system, for example the renin-angiotensin-aldosterone system. Although for most hormones and nonhormonal substances commercially prepared kits are available, every RIA system is described in such a manner that a laboratory system may be elaborated. For this purpose, the experience of competent groups is analytically presented as well as the procedures elaborated by the author and her coworkers (for example HGH and thyroglobulin). It is known that one of the main advantages of RIA is that, by contrast to the biological methods, it offers a single approach to the evaluation of all the peptide hormones and, by extension, of the steroid hormones, of the thyronines, etc. However, every particular hormone requires to know its unique features in order to be able to raise a good performance RIA system. Useful details of the modality needed to obtain an international reference preparation or reagent (antigen, antibody) from the specialized institutions (Medical Research Council-London or NIH-NIAMDD-USA) are noted especially for those laboratories working in isolation. Examining the resulting RIA data it is possible to estimate the contribution of these methods to the understanding of the fate and mechanisms of action of the hormones in the physiological and pathological conditions. Some examples illustrating the solutions obtained in endocrinology by an adequate use of the RIA capabilities (the peripheral concentrations, the secretion rate, the rate of metabolic clearance, the mechanisms of the control and regulation of the hormones, the free to bound ratio for thyronines and for the most part of the steroids, the hormonal interactions along the feedback circuits, long-time untouchable) are now at hand for every investigator. Also, during the last years the reverse of the medal became evident: the discrepancies between the laboratory RIA data and the clinical status of some patients, which generated new laboratory strategies and the association of new methodologies, the most important being the cytobioassay of hormones.

The conditions for collecting, transporting and storing the biological samples, for patient preparation and for the dynamic tests are considered for every hormone and for other substances. In the last decade, the explosive development of new dynamic tests is discussed in a large number of publications. Therefore, the author tried to select especially those of clinical value.

The RIA and related procedures extended rapidly to many domains of medicine. In Oncology, the measurement of hormones and of foeto-placental proteins is of great value in the diagnosis and for the following-up of the treatment efficiency (chapter 7: Hormones and foeto-placental proteins). Tumoral syndromes with hormonal hypersecretion are observed for the most part of the peptide hormones: HGH — acromegaly, insulin — panereas adenoma, parathormone — parathyroid adenoma, gastrin — Zollinger-Ellison syndrome and thyroglobulin — thyroid cancer metastasis. Some hormones are secreted also by tumoral ectopic tissues: ACTH, HGH, Vasopressin, HCG, HPL, Gastrin, Insulin, Glucagon, Parathormone, Calcitonine and Erythropoietine. The detection of beta-HCG in the blood is possible at very low size of the choriocarcinomatous tumour: one million of cells (one milligram of tumoral

tissue). The measurement of peptide molecules specific for certain tumours are of diagnostic value. The carcinoembryonic antigen (CEA), present in normal subjects in low concentrations, is often increased in the blood of persons having different types of neoplasias. Alpha foetoproteins (AFP) are peptides used especially for the diagnosis of the cancer of liver. The RIA methods and similar methods are widely used also in Immunology. For the measurement of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM and IgD), present in plasma at high concentrations, the classic immunochemical methods are satisfactory. However, IgE, present at low concentrations (about 1 p. 100 of the total Ig), is measured by RIA, being especially useful in allergies (chapter 11). In Virusology, the detection of the Australia antigen (HB_sAg) and of its antibody is also realized by an immunoradiometric method (chapter 12). The modern Toxicology appeals to the RIA capabilities for screening of population to determine the influence of pollutants and of other toxic substances and conditions upon the reproduction processes (chapter 8). In Pharmacology, the RIA method and its byproducts are widely used for the study of the purity of new synthesized releasing factors or of the hormones isolated from glandular tissues (ACTH, Insulin, HCG) realizing economies of laboratory animals by partially replacing fastidious biological methods. It is to be noted that the detection by RIA of noxious substances in some biological products used in human medicine as for example the HB_sAg in the human plasma and derivatives, is another field of application of clear social importance. Moreover, using the RIA methods it is possible to investigate accurately the hormonal effects of new drugs, for example the prolactin determinations before and during the treatment with bromergocryptine of the hyperprolactinemic patients. The large possibilities opened by radioimmunology to physiopathological studies by the aid of byproducts of the RIA systems, namely the radioactive tracer for metabolic studies or the specific antibody for selected cellular ectomy, are presented in an appendix.

The RIA is a domain belonging to the field of nuclear medicine — which, in turn, is a collection of many disciplines. The exquisitely sensitive analytic methods of RIA and related procedures have brought increased precision in the fields of human and animal biology (fundamental and applied). Looking through the symposia and congresses papers on endocrinology, gynaecology-obstetrics, diabetology, pediatrics, oncology, haematology, internal medicine, pharmacology, etc., it is easily observed that a substantial part of the results are based, explicitely or implicitely, on the new methods of measurement or on their byproducts. The proper understanding of the methodological and technical aspects seemed to the author the best way for an optimal exploitation of this young domain of "in vitro" measurements of a wide scale of substances, domain named briefly (however somewhat unproperly) — RIA.

The book is the first published in Romanian dealing with this subject. By comparison to other book on the same subject elaborated by multiple contributors, the content is based on the rather large practical and theoretical experience of the author allowing her to consider, from a methodological standpoint, the wide scientific literature published. The author has worked for more than fifteen years on immunohormonology and in the RIA domain. Together with her coworkers she produced immunochemical and RIA kits for hormones and for hormonoid substances. Many romanian and foreign graduates have specialized in her laboratory. The development of any new methodology involves, besides adequate scientific information, the supplementation of the technical conditions with new equipment. All these became possible due to the aid of the Institute of Endocrinology-Bucharest, of the Academy of Medical Sciences, of the Ministerium of Health and of the National Council for Science and Technology. Of great importance was the assistance offered by the State Committee for Nuclear Energy, by the United Nations Development Programme and by the International Atomic Energy Agency (Vienna), the last supporting the author's efforts by research contracts.

Scanned with OKEN Scanner